

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

CAROLINA DE SIQUEIRA GONÇALVES

SÍNTESE E PROPRIEDADES DE UMA NOVA FTALOCIANINA DE ZINCO  
CONJUGADA À ALBUMINA BOVINA

São José dos Campos, SP  
2008

**Carolina de Siqueira Gonçalves**

**“Síntese e Propriedades de uma nova Ftalocianina de Zinco  
conjugada à albumina bovina”**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Angélica G. Cardoso  
Co-Orientador: Prof.Dr. Milton Beltrame Junior

São José dos Campos, SP  
2008

G625s

Gonçalves, Carolina de Siqueira

Síntese e propriedades de uma nova ftalocianina de zinco conjugada à albumina bovina./ Carolina de Siqueira Gonçalves. São José dos Campos, 2007.

1 Disco laser: Color

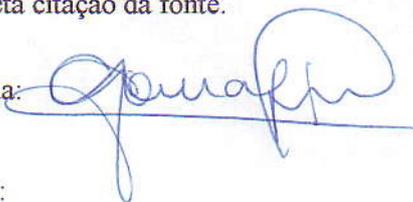
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2007.

1. Ftalocianina 2. Albumina Bovina 3. Células Hela 4. Química inorgânica I. Cardoso, Maria Angélica G. , Orient. II. Beltrame Jr., Milton, Co-Orient. III. Título

CDU: 546

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica, desde que seu uso implique na correta citação da fonte.

Aluna:



Data:

São José dos Campos, 15 de fevereiro de 2008

**CAROLINA DE SIQUEIRA GONÇALVES**

**“SÍNTESE E PROPRIEDADES DE UMA NOVA FTALOCIANINA DE  
ZINCO CONJUGADA À ALBUMINA BOVINA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **LEONARDO MARMO MOREIRA** (UNIVAP)

Prof.<sup>a</sup>. Dra. **MARIA ANGÉLICA GARGIONE CARDOSO** (UNIVAP)

Prof. Dr. **MILTON BELTRAME JUNIOR** (UNIVAP)

Prof.<sup>a</sup>. Dra. **DANIELA MANFRIM DE OLIVEIRA** (USP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 15 de fevereiro de 2008.

Ao Emílio Carlos Alonso,  
por todo amor, ajuda e  
compreensão.

Aos meus pais,  
pelo incentivo  
profissional.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Angélica Gargione Cardoso e ao Prof. Dr. Milton Beltrame Junior, obrigado por me aceitar como orientanda e me apresentar a Terapia Fotodinâmica, tema pelo qual tenho tido intenso interesse em pesquisar e estudar. A eles presto a minha homenagem e apresento os sinceros agradecimentos pela compreensão frente à minha ansiedade e a presteza em esclarecer todas as minhas dúvidas nunca se furtando em apresentar importantes observações para o desenvolvimento de nosso estudo.

À Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, por ter sempre me recebido em seu laboratório com disponibilidade e ao apoio técnico prestado por ela e também pela colega de seu laboratório Aline Helena Araújo Machado.

A Profa. Dra. Kumiko Koibuchi Sakane que, de modo sempre muito amigável e dedicado, não mediu esforços para me ensinar tudo sobre o infravermelho.

Às colegas do Laboratório de Síntese Orgânica e do Laboratório de Imunologia pela disponibilidade, auxílio, união e amizade demonstrados.

Ao colega Eduardo Mayrink pelo auxílio e amizade demonstrada.

Aos poucos, mas importantes amigos que estão a minha volta nas inúmeras horas de tristezas e alegrias com que foi elaborado este estudo – a minha amiga (irmã) Camila Pancote que foi um incentivo para mim.

Aos funcionários da Biblioteca Univap pelo atendimento e atenção.

À Univap por incentivar e proporcionar meu aperfeiçoamento profissional.

A toda minha família, pelo grande apoio e carinho sem o qual teria sido muito difícil.

*"A vida passa e abre caminhos que não  
são percorridos em vão".*

**Frida Khalo – O diário de Frida Khalo**

# SÍNTESE E PROPRIEDADES DE UMA NOVA FTALOCIANINA DE ZINCO CONJUGADA A ALBUMINA BOVINA.

## RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma nova forma de tratamento para tumores malignos envolvendo a interação de fotossensibilizantes com a luz, em um comprimento de onda específico e em presença de oxigênio molecular. A fim de intensificar a captura de fotossensibilizantes, o uso de conjugados tem sido estudado com o intuito de aumentar a sua especificidade em células tumorais. A maioria das ftalocianinas é hidrofóbica, o que facilita a sua passagem através da membrana celular, porém dificulta o seu uso durante o tratamento através de administração por via endovenosa. Para facilitar a administração desses compostos, muitos sistemas de liberação vêm sendo descritos, tais como: lipossomas, proteínas séricas, anticorpos monoclonais, entre outros. No presente trabalho, descrevemos a preparação de uma nova ftalocianina de zinco ligada covalentemente à albumina bovina (BSA) e estudamos sua interação com células cancerosas através de ensaios *in vitro*. A ftalocianina de zinco conjugada à BSA, a qual tem característica hidrofílica, foi obtida depois de quatro etapas a partir do composto 4-nitroftalonnitrila sendo no final purificada por coluna de sephadex seguida de liofilização. O espectro de absorção da Pc-iso exibiu um pico definido em 700 nm, mas por outro lado, a ftalocianina conjugada à BSA exibiu dois sinais (ombro) na região de 650-700 nm sugerindo uma possível agregação. A Pc-BSA e a Pc-iso, descritas nesse trabalho, foram então incubadas com duas linhagens de células tumorais, Hep-2 e HeLa, por períodos de 1, 6, 12, e 24 horas. Através de microscopia de fluorescência, verificamos que nas linhagens de células HeLa a internalização da Pc-BSA ocorreu a partir de 1 hora de incubação enquanto que nas linhagens de células Hep-2 após 12 horas de incubação, quando apresentaram inúmeros vacúolos no citoplasma celular. A Pc-iso interage de uma maneira uniforme com ambas as linhagens ocorrendo na linhagem de células Hep-2 a presença de vacúolos após 12 e 24 horas. Acreditamos que a Pc-BSA apresenta uma internalização mais rápida, mediada por endocitose devido ao aparecimento de vacúolos a partir de 1 hora de incubação.

**Palavras-chaves:** Ftalocianina, Albumina Bovina, HeLa e Hep-2.

# SYNTHESIS AND PROPERTIES OF A NOVEL ZINC PHTHALOCYANINE CONJUGATED TO SERUM ALBUMIN

## ABSTRACT

Photodynamic therapy is a new kind of treatment against malign tumors involving photosensitizers with light, in a specific wavelength and in presence of molecular oxygen. To intensify the uptake of photosensitizers, the use of conjugates are being studied in order to increase its specificity to tumor cells. Most of phthalocyanines are hydrophobic, which facilitate its penetration by crossing cellular membranes, but difficult its use for treatment by intravenous administration. To facilitate the administration of these compounds, many drug delivering systems have been investigated including: liposome, serum proteins, monoclonal antibodies and others. In the present work, we describe the preparation of a new zinc phthalocyanine covalent bound to bovine serum albumin (BSA), and studied its interaction with cancer cells through *in vitro* assays. The zinc phthalocyanine conjugated to BSA (Pc-BSA), with hydrophilic characteristic, was obtained from 4-nitroftalonitrile and purified by sephadex column, followed by lyophilization. The absorption spectra of Pc-iso showed a defined peak in 700 nm, on the other hand, the conjugated Pc exhibited two peaks (shoulder) in range from 650-700 nm suggesting an aggregation. Both Pc-iso and Pc-BSA were incubated with two cancer cell lineages, Hep-2 and HeLa, for 1, 6, 12 and 24 hour period. Through fluorescence microscopy it was found that HeLa cells internalized Pc-BSA from 1 hour of incubation besides Hep-2 lineage cells after 12 hour of incubation, when we found vacuoles in cellular cytoplasm. Pc-iso interacts uniformly with both lineages occurring in Hep-2 cells the presence of vacuoles after 12 and 24 hour of incubation. We can observe that Pc-BSA was internalized very fast, probably mediated by an endocytosis because of the presence of vacuoles from 1 hour of incubation.

Keywords: Phthalocyanines, bovine serum albumin, HeLa, Hep2.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Diagrama de Jablonski	17
Figura 02- Preparação do fármaco Photofrin®	22
Figura 03- Fármaco Levulan® Kerastick	23
Figura 04- Espectroscopia no infravermelho do composto tetra-nitro-ftalocianina de zinco	40
Figura 05- Espectroscopia no infravermelho do composto tetra-amino-ftalocianina de zinco	42
Figura 06 Espectroscopia no infravermelho do composto tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco	43
Figura 07- Espectro de absorção da Pc-iso e Pc-BSA	46
Figura 08- Dosagem da albumina	47
Figura 09- Linhagens de células Hep-2 incubadas com a Pc-iso	49
Figura 10- Linhagens de células HeLa incubadas com a Pc-iso	51
Figura 11- Linhagens de células Hep-2 incubadas com a Pc-BSA	53
Figura 12- Linhagens de células HeLa incubadas com a Pc-BSA	55
Figura 13- Atividade Mitocondrial medida por ensaio de MTT da Pc-iso	57
Figura 14- Atividade Mitocondrial medida por ensaio de MTT da Pc-BSA	58

## **Abreviaturas e Siglas**

3THPP – Tetrahidroxifenilporfirina

AlPcS4 - Ftalocianina Cloro-alumínio Tetrasulfonada

BSA- albumina bovina

DMSO – Dimetilsulfóxido

EROS - Espécies reativas de oxigênio

Fs – Fármaco fotossensibilizador

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

MEM - Mínimal Essential Medium

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide

PBS – Salina tamponada com fosfato

Pc-BSA - Ftalocianina de zinco conjugada à albumina bovina

Pc-iso - Tetra-isotiocianato ftalocianina de zinco

Pf – Photofrin®

SFB - soro fetal bovino

TFD – Terapia Fotodinâmica

TPPS1 - Tetrafenilporfirina sulfonada

UV- ultra violeta

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Terapia Fotodinâmica	16
1.2	Mecanismos físico-químicos envolvidos na TFD	17
1.3	Mecanismos de ação	19
1.4	Fármacos fotossensibilizadores	20
1.5	Características dos fármacos fotossensibilizadores sob aspectos biológicos	23
1.6	Ftalocianinas	24
1.7	Albumina	25
1.8	Organelas citoplasmáticas e PDT	26
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Introdução	30
3.2	Sínteses	30
3.2.1	Preparação da tetra-nitro-ftalocianina de zinco	32
3.2.2	Preparação da tetra-amino-ftalocianina de zinco	32
3.2.3	Preparação da tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco	34
3.2.4	Conjugação da proteína BSA	35
3.3	Espectro de absorção	35
3.4	Dosagem de proteína	35
3.5	Linhagem celular	35
3.6	Meio de cultura	35
3.7	Crescimento e manutenção das culturas de células	36
3.8	Fármaco fotossensibilizador e interação celular	36
3.9	Microscopia de fluorescência	37
3.10	MTT- Teste de citotoxicidade celular	38
4	RESULTADOS	38
4.1	Resultados das preparações das ftalocianinas	38
4.1.1.	Preparação da tetra-nitro-ftalocianina de zinco	38
4.1.2.	Preparação da tetra-amino-ftalocianina de zinco	39
4.1.3.	Preparação da tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco	41
4.2	Conjugação da proteína BSA	42
4.3	Espectro de absorção	42
4.4	Dosagem de proteína	43
4.5	Microscopia de fluorescência	44
4.6	MTT- Teste de citotoxicidade celular	53
5	DISCUSSÕES	56
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma nova forma de tratamento que têm sido aplicada para tumores malignos envolvendo a interação do fármaco fotossensibilizador com a luz, em um comprimento de onda específico, em presença de oxigênio molecular (HENDERSON *et al.*, 1985). A TFD consiste de uma seqüência de processos fotoquímicos e fotobiológicos cujo resultado é um dano irreversível ao tecido tumoral (DOUGHERTY *et al.*, 1998; BELMONT *et al.*, 1999; LIPSON; BALDES, 1960 ). Após a aplicação de uma radiação de comprimento de onda adequado, várias reações fotoquímicas ocorrem nas células sensibilizadas, gerando a liberação de oxigênio singlete, altamente reativo, que resulta em morte destas células.

A TFD ocorre por dois passos: O fármaco fotossensibilizador é o primeiro a ser administrado, intravenosamente, e é carregado pelo corpo durante um tempo o qual é retido seletivamente por alguns tecidos. A retenção seletiva depende das propriedades bioquímicas individuais de cada tipo de tecido e é influenciada por fatores tais como: capacidade de ligação das proteínas ao tecido, características da membrana, pH e área suprida de sangue. (VAZQUEZ *et al.*, 2007).

A seletividade do tecido tumoral em relação ao do tecido normal é uma importante consideração quando projetado pelo uso em TFD, para o tratamento de câncer. Após um determinado tempo, ocorre retenção seletiva do fármaco fotossensibilizador no tumor e o tecido alvo é irradiado com luz. A luz pode ser levada através da pele para o tumor relativamente superficial ou por fibras óticas para o tumor profundo, os quais são endoscopiaismente acessíveis. O volume do tecido tratado é determinado pela penetração da luz no tecido. A combinação da luz e do fármaco fotossensibilizador produz um coquetel, altamente reativo o qual causa destruição das células.

O Fs deve apresentar características importantes que devem ser consideradas, como: propriedades de toxicidade baixa, seletividade para permanecer acumulado nas células tumorais, possuir uma banda de absorção na



A luz interagindo com o corante, torna-o excitado passando de seu estado fundamental ( $S_0$ ) ao estado triplete ( $T_1$ ). Neste segundo estado, sua meia vida é de poucos milionésimos de segundos, durante o qual é capaz de rápida energização do oxigênio dissolvido, que é ativado para seu primeiro estado eletrônico excitado. Este estado energético ( $^1O_2$ ) também é de vida curta, porém muito reativo. Típicas moléculas orgânicas sensibilizadoras são convertidas a estado singlete ( $S_1$ ) de vida curta na absorção do fóton. O estado excitado singlete ( $S_1$ ) de bons fotossensibilizantes, passa eficientemente pelo cruzamento inter-sistema para atingir o estado triplete ( $T_1$ ), como mostrado na figura 01. A maioria das reações fotossensibilizadas nos sistemas biológicos é mediada por este estado ( $T_1$ ) do fármaco fotossensibilizador devido ao seu tempo de vida prolongado.

A transmissão da energia gerada do estado triplete para singlete pode ocorrer por dois tipos de reações freqüentemente designadas tipo I e tipo II. O mecanismo de reação depende do meio, do fármaco fotossensibilizador, do tempo de vida do  $^1O_2$  e da estabilidade dos radicais gerados. (HERWIG; OBWEGESER; JAKOBER, 1996). Na reação do tipo I, as moléculas do fármaco fotossensibilizador interagem diretamente com os substratos biológicos para formarem radicais livres. O processo inclui as reações de transferência de elétron entre a molécula do fármaco fotossensibilizador nos seus estados excitados e as moléculas do substrato biológico, que reagem instantaneamente com o oxigênio molecular, produzindo uma mistura de moléculas intermediárias chamadas de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), como radical superóxido ( $^*O_2^-$ ), radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2^*$ ) e radical hidroxila ( $^*OH$ ), que são capazes de oxidar várias biomoléculas (KRAMMER; HEIDEGGER, 1996). Este mecanismo é favorecido pelo uso de fármaco fotossensibilizador que absorve na região espectral ultravioleta, devido aos estados tripletes apresentarem energias relativamente altas, facilitando reações de transferência de hidrogênio e por consequência a formação de radicais (HERWIG; OBWEGESER; JAKOBER, 1996).

Na reação do tipo II, as moléculas do fármaco fotossensibilizador absorvem energia, passam para um estado de excitação molecular chamado estado triplete. A energia absorvida é transferida para o oxigênio molecular, gerando um rendimento de oxigênio singlete. O oxigênio singlete é representado simbolicamente como  $^1O_2$ , para se diferenciar do estado natural, o oxigênio triplete ( $^3O_2$ ). O  $^1O_2$ , devido à sua instabilidade, pode gerar reações em cadeia, que liberam grandes

quantidades de energia, o que causa ruptura física das membranas celulares, prejudica as funções de transporte das membranas, oxida as organelas celulares, como a mitocôndria, e em menor escala induz à ruptura das fitas de DNA, causando a regressão do tumor (EDREI; KIMEL, 1999).

Ambas as reações (tipo I e tipo II) podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas é influenciada pelas características do fármaco fotossensibilizador, substratos intracelulares e concentração de oxigênio do meio.

### **1.3 Mecanismos de ação**

É necessária a compreensão do mecanismo de ação de efeito da TFD no metabolismo celular e em tecidos afetados por este tipo de terapia, para um melhor conhecimento e aprimoramento de drogas cada vez mais específicas para células tumorais, sem comprometimento das células normais.

A fonte de luz deve apresentar absorção adequada, centrada na região do espectro onde a luz possa excitar o Fs utilizado, transferindo energia, formando espécies radicais para que a TFD seja eficiente. É importante que a fonte de luz seja monocromática para que quantidades de energia fora da faixa de absorção do Fs não cause reação adversa, como aquecimento do tecido.

O aumento da eficácia da TFD pode ser conseguido obtendo-se uma melhor seletividade do fármaco fotossensibilizador no tecido alvo. Uma das maneiras seria a agregação do fármaco fotossensibilizador a ligantes como: anticorpos monoclonais, lipoproteínas entre outros (SUTTON *et al.*, 2002).

Conjugações covalentes de fármaco fotossensibilizador a ligantes de reconhecimento específico favorecem a internalização da droga por receptores de superfície celular aumentando a seletividade da TFD (BRASSEUR *et al.*, 1999).

Um dos problemas limitantes para o uso de fármacos fotossensibilizadores na TFD são as preparações farmacêuticas ideais para a administração parenteral. A maioria dos Fs são hidrofóbicos e portanto, não podem ser administrados intravenosamente. Diferentes estratégias, incluindo conjugação de polímeros-Fs ou encapsulamento da droga à sistema de liberação coloidal, tais como: dispersões oleosas, lipossomos e partículas poliméricas, tem sido investigadas afim de possibilitar a administração desses Fs em pacientes. Embora

esse sistema de liberação coloidal tende a se acumular seletivamente no tecido tumoral, eles também são rapidamente capturados pelos fagócitos.

Na intenção de melhorar a seletividade da liberação dos fármacos fotossensibilizadores para o tecido tumoral, pesquisas incluindo sistemas de liberação macromolecular vêm sendo desenvolvido. A idéia começou com o uso de drogas conjugadas à macromoléculas, as quais mostraram melhorar a distribuição da droga. TANAKA *et al.* (2004) propuseram um sistema de liberação macromolecular onde puderam concluir que o Fs conjugado a albumina acumulava-se efetivamente no tecido tumoral e que a distribuição desse conjugado depende de suas propriedades físico-químicas.

Teoricamente essa associação tem diversas vantagens, tais como: alta afinidade de ligação pelos receptores localizados na superfície da célula; localização direta e mais específica com o aumento da eficiência e seletividade, e baixa dose efetiva de fármacos fotossensibilizadores. A eficiência dessa estratégia é governada por diversos fatores como: estabilidade do conjugado na circulação sanguínea, proteção contra possíveis inativações durante o transporte e ativação do tecido alvo, habilidade do conjugado de atravessar barreiras fisiológicas e ligar-se a sítios de reconhecimento e, ainda, não apresentar toxicidade (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

Também vem sendo dispensada uma maior atenção ao uso de lipoproteínas plasmáticas devido a sua estabilidade e direta relação entre o número de receptores lipoprotéicos encontrados em diversos tumores e o reconhecimento do fármaco fotossensibilizador pelas células malignas. As lipoproteínas vêm sendo sugeridas como uma razão importante para o transporte e liberação das moléculas de fármacos fotossensibilizadores nas células tumorais. Os tumores geralmente se caracterizam pela freqüente proliferação, expressão de receptores e moléculas diversas em grandes quantidades na superfície celular (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

#### **1.4 Fármacos fotossensibilizadores**

Fármaco fotossensibilizador (Fs) é usualmente definido como uma substância que induz sensibilidade luminosa para processos químicos e físicos, geralmente insensíveis a luz (SIBATA *et al.*, 2000). Eles absorvem a energia

luminosa e induzem a produção de espécies reativas de oxigênio na natureza tumoral, gerando uma cascata de reações bioquímicas. Essas reações resultam em danos microvasculares, morte da célula tumoral e indução de uma resposta imune inflamatória seguida, eventualmente por necrose, apoptose ou regressão do tumor (BRASSEUR *et al.*, 1999).

As propriedades fotoquímicas dos Fs são importantes para a sensibilização de tecidos cancerosos. O Fs deve preferencialmente ser um composto puro, deve ser capaz de se localizar em tecidos neoplásicos, ser ativado por comprimentos de onda que sejam ideais não só para sua ativação, mas também para a penetração em tecidos, rápida eliminação pelas células normais, ser atóxico no escuro e apresentar alta produção de espécies reativas de oxigênio (LUKSIENE, 2003). Preferencialmente esses compostos devem ser solúveis em água e não devem agregar excessivamente em meios biológicos.

O primeiro Fs testado clinicamente foi o HpD (derivados de hematoporfirina), uma mistura complexa de porfirinas. Sua purificação deu origem ao Photofrin® (figura 02), o primeiro agente fototerapêutico a ter seu emprego em TFD autorizado por órgãos governamentais nos EUA (MACHADO, 2000).

Há vários fármacos fotossensibilizadores aprovados e sendo utilizados atualmente em tratamentos clínicos. Entre eles podemos citar: Photofrin® (USA, Canadá), Photoscan® (Alemanha), HpD® (China), Photogem® (Rússia), Derivado de Benzoporfirina (Canadá), ácido 5-aminolevulínico (ácido 5-amino-4-oxopentanóico) (ALA) (Europa e USA). (SIMPLICÍO; MAIOCHI; HIOKA, 2002).

Embora o Photofrin® (P11) represente um importante progresso na pesquisa de terapias oncológicas, com pequenos efeitos colaterais, há algumas desvantagens a serem citadas: 1) tem pequena absorção na região espectral; 2) sua excreção é lenta pelo organismo, devido ao fato de ser retido em vários tipos de tecidos normais como pele e fígado por períodos de 4 a 6 semanas, resulta em uma prolongada fotossensibilidade; 3) é constituído por uma mistura complexa de derivados de hematoporfirinas, dificultando o isolamento e purificação da droga (SILVA, 2003).

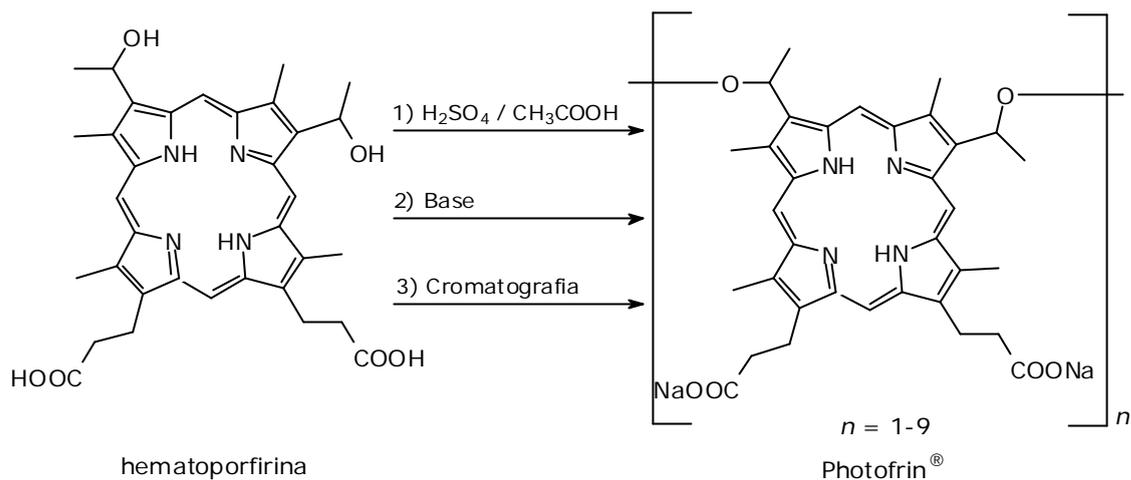


Figura 02 Preparação do fármaco Photofrin® a partir da hematoporfirina.

O Photoscan® e o Photogem® são variedades comerciais do Photofrin® (SILVA, 2003).

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é um dos Fs mais empregados na TFD. Ele funciona como uma pró-droga, isto é, age como um precursor na via da biossíntese de grupamentos heme (MORGAN, OSEROFF, 2001). O ALA após uma série de transformações metabólicas, é convertido em protoporfirina IX dentro da mitocôndria pela enzima porfobilinogênio deaminase e é então convertida em heme pela enzima ferroquelatase (ZHANG, ZHEN, 2005). Em células malignas há um aumento na atividade da porfobilinogênio deaminase e deficiência na atividade da ferroquelatase. Conseqüentemente a protoporfirina IX, que possui excelente propriedade fotossensível, é acumulada podendo então um tecido ou uma cultura de células, ser irradiada com laser (GREBENOVA *et al.*, 2000).

O princípio ativo do fármaco Levulan® Kerastick (DUSA Pharmaceuticals) é obtido a partir do ácido 5-aminolevulínico (ALA) (figura 03), esses fármacos fotossensibilizadores foram aprovados e são utilizados atualmente em tratamentos clínicos (SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

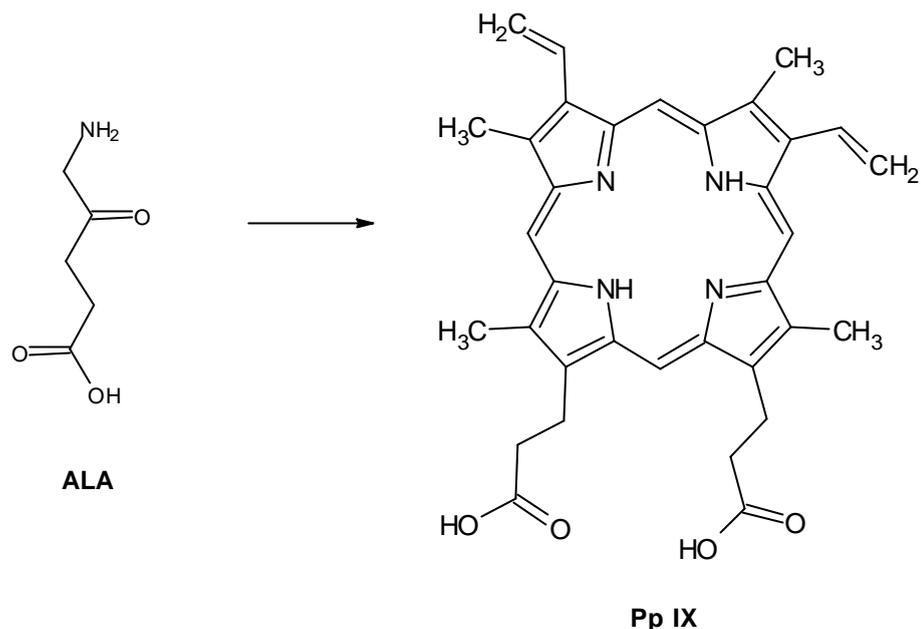


Figura 03.Fármaco Levulan® Kerastick

Uma variedade de componentes fotossensibilizantes sintéticos de segunda geração tem sido produzidos, entre eles, os mais promissores são as ftalocianinas.

As ftalocianinas formam uma vasta classe de componentes com alto coeficiente de absorvidade molar na região espectral vermelha (630-750 nm), mostrando excelentes propriedades de localização tumoral e alta eficiência fotossensibilizante, com penetração ótima de luz no tecido (SUTTON *et al.*, 2002). A eficácia das características biológicas dos Fs é frequentemente determinada pela distribuição subcelular entre as células neoplásicas, a qual depende de características estruturais e propriedades físico-químicas do Fs.

### 1.5 Características do fármaco fotossensibilizador sob aspectos biológicos

Para escolher o fármaco fotossensibilizador na TFD, leva-se em consideração a absorção espectral acima de 600 nm, bem como a retenção seletiva dos fármacos fotossensibilizadores pelos tecidos neoplásicos em benefício dos tecidos saudáveis (HARRIS, 1991).

Moan *et al.*, (1992), demonstraram que as ações celulares dos componentes derivados de Hematoporfirina aumentam com o aumento da

lipofobicidade dos componentes, esses efeitos também foram observados para ftalocianinas, diésteres de hematoporfirinas e a tetrafenilporfirina sulfonada. Porém a ação celular não está relacionada somente com a lipofobicidade, a massa molar e o centro metálico do Fs também são de grande importância. Uma das características desejadas é a pureza, já que substâncias puras simplificam a interpretação da relação dose-resposta. A substância deve ainda ter pouca ou nenhuma toxicidade na ausência de luz e ser cinética e termodinamicamente estável (DELAEY *et al.*, 2000)

Algumas características que um fármaco fotossensibilizador ideal, deve apresentar:

- 1) Máxima absorção perto da região do infravermelho,
- 2) Retenção seletiva no tecido tumoral, com maiores concentrações do que nos tecidos saudáveis;
- 3) Baixa toxicidade;
- 4) Ser capaz de gerar o oxigênio *singlete*;
- 5) Formação mínima de agregados, os quais reduzem sua habilidade funcional;
- 6) Meia vida compatível com o uso clínico, sem que haja foto-degradação com luz natural;
- 7) Os compostos e metabólitos não devem ser tóxicos.

O estado de agregação das moléculas do fármaco fotossensibilizador modifica suas propriedades foto-físicas, diminuindo o tempo de vida do estado triplete e, por consequência, o rendimento de oxigênio *singlete*, através de dissipação de energia. (BRASSEUR *et al.*, 1999; STAR *et al.*, 1986).

## 1.6 Ftalocianinas

Ftalocianinas são moléculas tetraazoindólicas, cuja estrutura molecular pode ser modificada, inserindo-se ligantes periféricos e axiais, bem como metais e não metais entre os quatro nitrogênios centrais, permitindo que o fármaco fotossensibilizador seja sintetizado com as propriedades desejadas, ou seja, características espectroscópicas e fotofísicas podem ser estudadas na molécula do fármaco fotossensibilizador (COOK *et al.*, 1994; JORI, 1996).

Os dois grupos de corantes que têm sido mais extensivamente estudados em relação à TFD são as Ftalocianinas e as Porfirinas. Sob muitos aspectos essas

drogas parecem agir similarmente. Até certo ponto, elas são seletivamente absorvidas ou retidas nos tecidos dos tumores, e seu efeito fotossensibilizador é tido como originário principalmente da trajetória do oxigênio singleto (MOAN *et al.*, 1991).

Contudo, há diferenças entre os membros desses dois grupos: uma tendência generalizada é que os corantes lipofílicos tais como tetrahidroxifenilporfirina (3THPP), Photofrin II (PII), diésteres de hematoporfirina (HP), tetrafenilporfirina sulfonada (TPPS1), localizam-se em diferentes membranas (mitocôndriais, nucleares, plasmáticas e retículo endoplasmático), enquanto que corantes mais hidrofílicos, tais como TPPS20, TPPS4, TPPS2a, ftalocianina Cloro-alumínio tetrasulfonada (AIPcS4, AIPcS2a), localizam-se extensivamente nos lisossomas (MOAN *et al.*, 1991). A quelação de íons metálicos, como Zinco e Alumínio, triplicam o tempo de vida do fármaco fotossensibilizador no estado tripleto, aumentando a probabilidade da reação com o substrato (WOOD; HOLROYD; BROWN, 1997; FERNANDEZ; AWRUCH; DICELIO, 1997). Interessantemente, a diferença entre as Ftalocianinas de Alumínio e as Porfirinas (Tetrafenilporfirinas) pode estar relacionada ao centro metálico, que tende a impedir a agregação.

As ftalocianinas apresentam altos coeficientes de extinção para comprimentos de onda longos, propriedade intensificadora da sua capacidade de fotossensibilização, em se considerando os comprimentos de onda desejados no tratamento. Elas podem ser facilmente sintetizadas com uma variedade de diferentes grupos secundários, capazes de alterar a carga total e a solubilidade da molécula, características que afetam sua adaptação às células do tumor. Estas propriedades também podem ser utilizadas para marcar membranas como a plasmática, a mitocondrial, a nuclear e a do retículo endoplasmático, e ainda para marcar organelas celulares particulares cuja susceptibilidade à terapia fotodinâmica é provavelmente maior.

## **1.7 Albumina**

A albumina é a proteína sérica mais abundante encontrada no organismo humano, apresenta uma concentração dez vezes maior que o total da concentração de todas as lipoproteínas, sendo amplamente estudada no campo da bioquímica. É constituída por 585 aminoácidos, formando um simples polipeptídeo, com massa molar de aproximadamente 66.000 Da. Apresenta papel biológico importante

incluindo regulação osmótica da pressão sanguínea e transporte de ácidos graxos, além de possuir capacidade única de se ligar covalentemente e reversivelmente a um grande número de vários componentes endógenos e exógenos. (SHARMAN; VAN LIER; ALLEN, 2004). Existem diferentes transportadores protéicos no plasma sanguíneo, mas somente a albumina sozinha é capaz de se ligar reversivelmente a uma ampla diversidade de ligantes com alta afinidade. A albumina também é uma importante fonte de aminoácidos para a célula, podendo ser encontrada no fluido intersticial.

São caracterizadas por conterem um número pequeno de resíduos de triptofano e metionina e um alto número de cistina e aminoácidos carregados, ácidos aspártico e glutâmico, além de lisina e arginina. O conteúdo de glicina e isoleucina é menor que a média encontrada em proteínas. Tanto a albumina bovina (BSA) quanto a albumina humana (HSA) possuem apenas um resíduo de cisteína livre, Cys34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A estrutura secundária da BSA contém muitos resíduos de cisteína e estes são helicoidais em grande parte da cadeia. Apresenta fácil isolamento em grandes quantidades, favorecendo sua alta estabilidade e solubilidade. A BSA passa por mudanças reversíveis na sua conformação, usualmente sob condições não-fisiológicas (TATTINI ; PARRA ; PITOMBO, 2006).

## **1.8 Organelas citoplasmáticas e PDT**

Muitos processos bioquímicos vitais ocorrem na superfície das membranas. A maior parte do metabolismo de lipídeos, por exemplo, é catalisada por enzimas ligadas às membranas. As membranas formam compartimentos fechados que estão separadas do citosol, suprimindo as células com espaços aquosos funcionalmente especializados. Como a bicamada lipídica, componente das membranas das organelas, é impermeável a maioria das moléculas hidrofílicas, a membrana de cada organela deve, necessariamente conter proteínas de transporte que são responsáveis pela importação e exportação de metabólitos específicos. Cada membrana de organela deve conter também um mecanismo de importação de proteínas específicas, que tornam esta organela única.

O núcleo contém o genoma e é o sítio mais importante da síntese de DNA e RNA.

O citoplasma que envolve o núcleo, consiste do citosol e das organelas nele suspensa. O citosol representa pouco mais da metade do volume celular total e é o sítio de síntese de proteínas, onde ocorre a maior parte do metabolismo intermediário, isto é, as muitas reações pelas quais algumas moléculas pequenas são degradadas e sintetizadas para fornecer os componentes primários para a construção das macromoléculas.

O retículo endoplasmático (R.E) contém muitos ribossomos ligados a sua superfície citosólica. Estes são engajados na síntese de proteínas integrais da membrana e proteínas solúveis, muitas das quais estão destinadas à secreção ou a outras organelas. Isto reflete uma importante diferença entre o direcionamento das proteínas para o R.E e para outras organelas citoplasmáticas. O R.E também produz os lipídios para o resto da célula e funciona como reservatório de íons  $\text{Ca}^{+2}$ .

O complexo de Golgi consiste de pilhas organizadas de compartimentos em forma de disco denominados cisternas de Golgi. Estas recebem lipídeos e proteínas do R.E e os direcionam para uma variedade de destinos, usualmente provocando modificações covalentes durante o processo.

As mitocôndrias geram a maior parte de ATP usado para gerar as reações celulares que necessitam de energia livre.

Os lisossomos contêm enzimas digestivas que degradam as organelas intracelulares não operativas, assim como macromoléculas e partículas incorporadas do exterior da célula por endocitose.

Os lisossomos são sacos membranosos de enzimas hidrolíticas usadas para digestão intracelular controlada de macromoléculas. Eles contêm cerca de quarenta tipos de enzimas hidrolases, incluindo proteases, nucleases, glicosidases, lipases, fosfolipases, fosfatases e sulfatases, sendo todas hidrolases ácidas. Para sua atividade ótima elas necessitam de ambiente ácido, e o lisossomo propicia tal condição mantendo um pH de aproximadamente 5 em seu interior.

Como as demais organelas intracelulares, o lisossomo não apenas contém uma coleção única de enzimas, mas também tem uma membrana circundante única. Proteínas transportadoras nesta membrana permite que os produtos finais da digestão de macromoléculas, como aminoácidos, açúcares e nucleotídeos, sejam transportados para o citosol, de onde podem ser excretados ou reutilizados pela células.

O material a ser ingerido é progressivamente, envolvido por uma pequena porção da membrana plasmática, que primeiro invagina e depois se fecha e se desprende formando uma vesícula intracelular, que contém a substância ou material ingerido. Dois tipos principais de endocitose podem ser distinguidos com base no tamanho das vesículas endocíticas formadas: a pinocitose e a fagocitose.

Vazquez *et al.* (2007) demonstraram que conjugados de ftalocianina de zinco a macromoléculas são localizados preferencialmente nos lisossomos, os quais após exposição à luz podem ser liberados destes para serem reutilizados por outras organelas.

Wood, Holroyd e Brown (1997) relataram que os lisossomos são inicialmente o sítio de localização dos Fs e que seguida a exposição da luz, liberam a droga para localizarem-se em outras organelas.

Brasseur *et al.* (1999) discutem a agregação dos conjugados em soluções aquosas, onde relatam que essa agregação típica de conjugados não interfere na atividade biológica uma vez que o local preferencial são os lisossomos, onde após a degradação da proteína libera a droga para atingir outras organelas celulares.

## 2 OBJETIVOS

Os principais objetivos de nosso trabalho são:

2.1 Propor uma rota sintética para uma nova ftalocianina de zinco ligada covalentemente à albumina bovina.

2.2 Fazer estudos *in vitro* de interação da ftalocianina conjugada e de sua precursora, com linhagens de células HeLa (carcinoma de cólo de útero) e linhagens de células Hep-2 (carcinoma de laringe) em diferentes concentrações e tempos de incubação, na ausência de luz.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Introdução**

Os nomes dos compostos foram atribuídos de acordo com as regras IUPAC para nomenclatura de compostos orgânicos.

Os solventes utilizados foram das marcas Aldrich, Merck ou Acros.

As cromatografias em camada delgada foram realizadas utilizando-se placa de sílica gel GF<sub>254</sub> da Merck sobre suporte de vidro ou alumínio e a cromatografia em coluna foi realizada utilizando sílica gel com partículas de tamanho 20-45 µm.

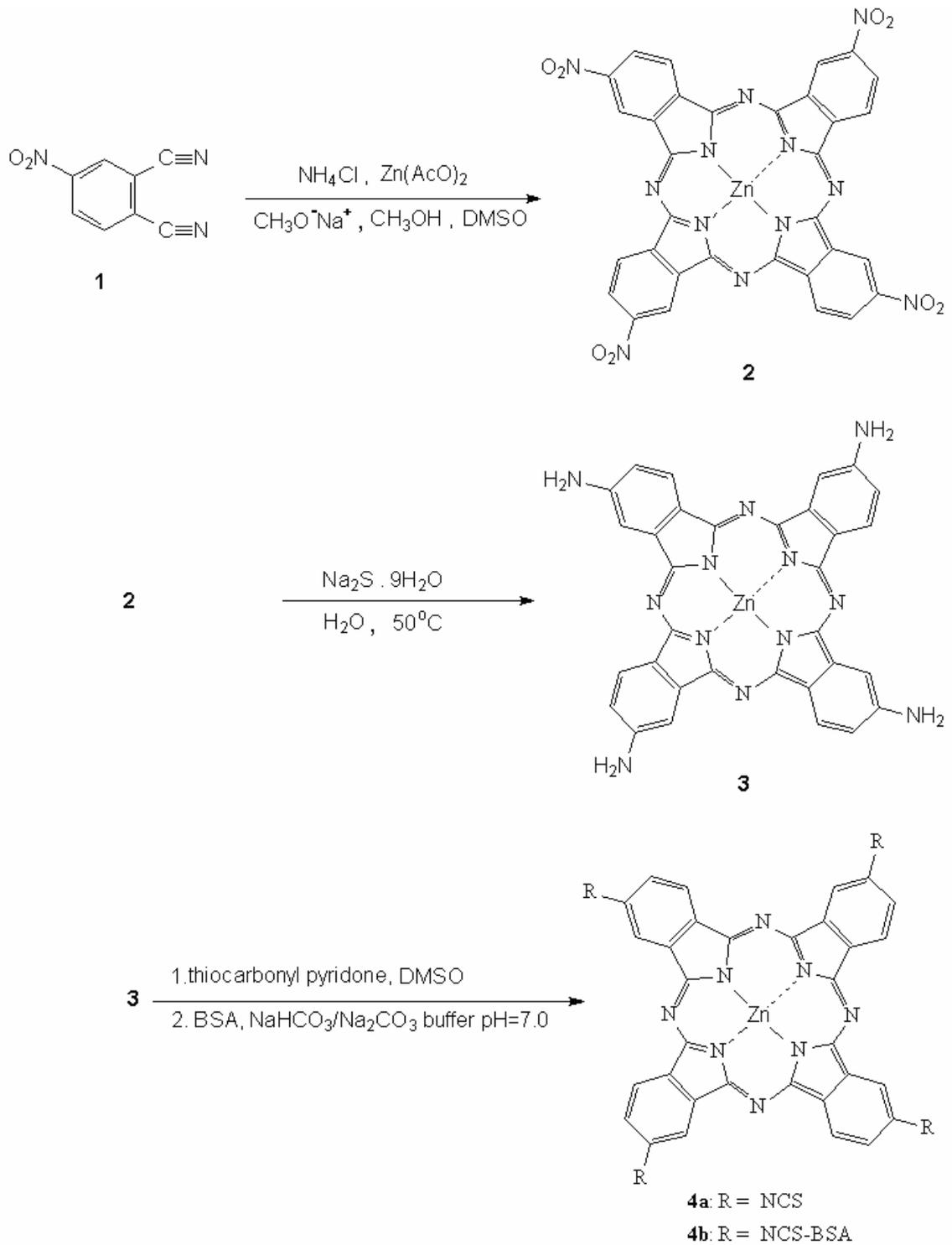
Os espectros de infravermelho foram realizados no espectrofotômetro (Perkin Elmer FT-IR - spectrometer 2000) usando pastilhas de KBr e os espectros de UV-VIS foram realizados em um Espectrofotômetro (Cary 50 BIO-Varian Inc. Scientific Instruments, Australia).

### **3.2 Síntese**

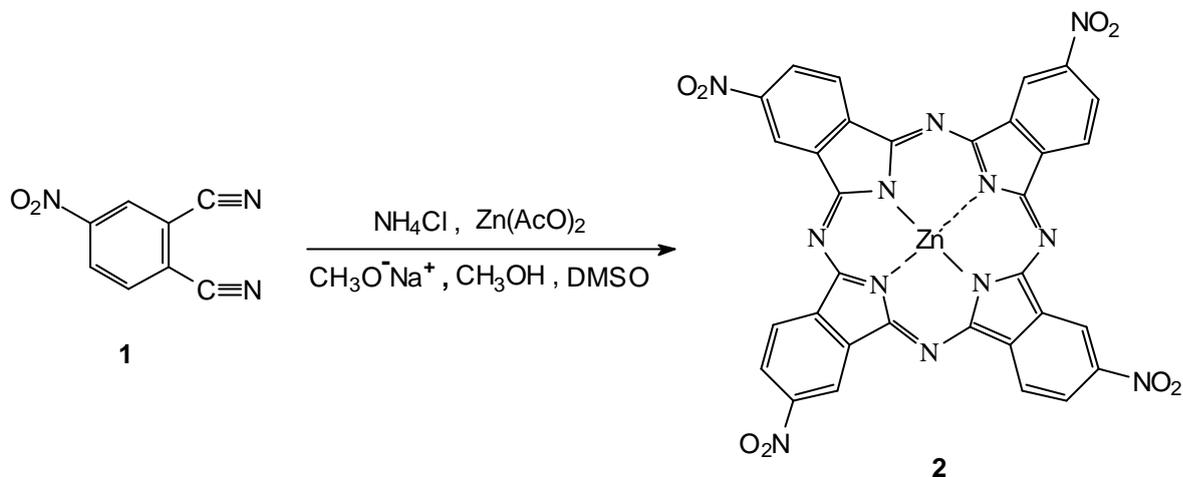
Utilizando-se de metodologias clássicas em síntese orgânica sintetizamos novos derivados de ftalocianinas. Dados da literatura mostram que, quando determinados substituintes estão presentes, existe potencialização de algumas propriedades farmacológicas (DOUGHERTY, 1978).

A preparação do complexo conjugado Pc-BSA foi realizada a partir da transformação do material de partida comercial a 4-nitro-ftalonitrila em quatro etapas. A sequência das reações, suas condições, assim como os seus rendimentos, estão resumidos no Esquema I.

## ESQUEMA I



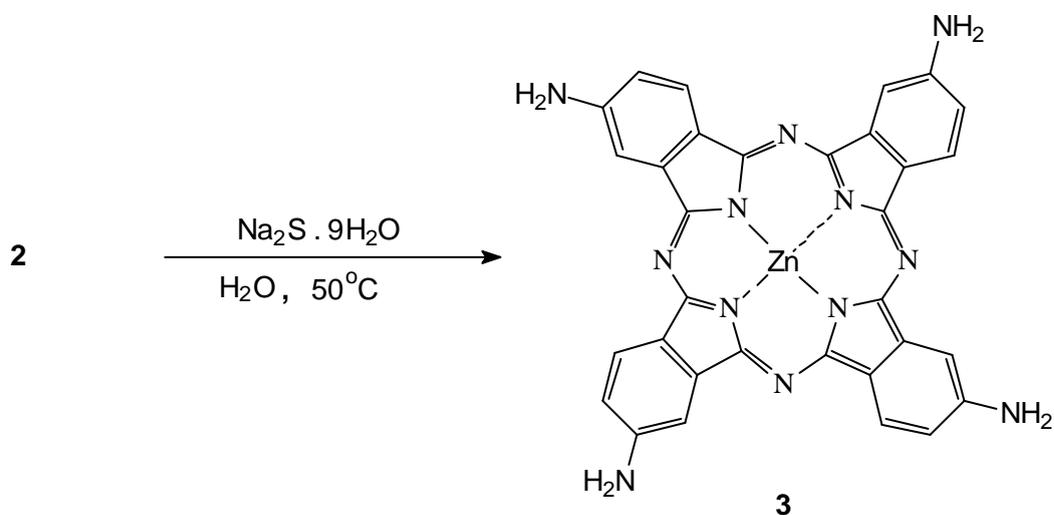
### 3.2.1 Preparação da tetra-nitro-ftalocianina de zinco



Para preparação da tetra-nitro-ftalocianina de zinco foi adicionado ao balão nitroftalonitrila (2,6g, 15mmol), cloreto de amônia ( 0,875g, 16mmol), acetato de zinco ( 0,715g, 3,9mmol), hidróxido de sódio (0,6g, 15mmol), metóxido de sódio (0,1g) e dimetilsulfóxido (7,5mL). A reação foi mantida em refluxo à 180°C e agitação constante por 4 horas sob atmosfera de nitrogênio.

Após reação a mistura reacional foi lavada com etanol e água por repetidas vezes. O produto sólido foi dissolvido em acetona e concentrado por rotaevaporação para dar o composto tetra-nitro-ftalocianina de zinco (0,53g; 0,69mmol) o qual foi utilizado na reação subsequente.

### 3.2.2 Preparação da tetra-amino-ftalocianina de zinco

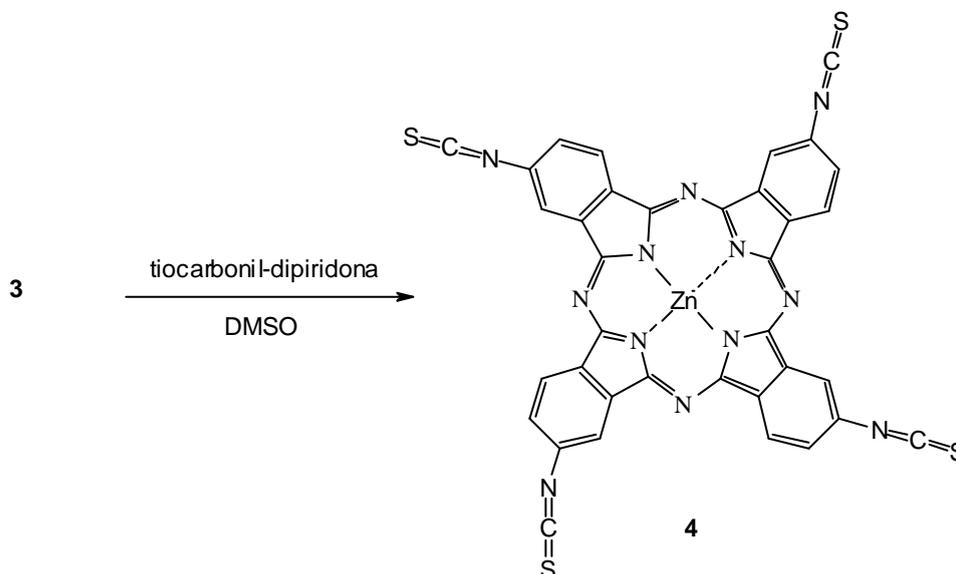


Utilizando um condensador de refluxo, foi adicionado ao balão H<sub>2</sub>O (5mL), tetra-nitro-ftalocianina de zinco (0,2g; 0,26mmol) e sulfeto de sódio nonahidratado (1,0g, 4,16mmol). A reação foi mantida à 50°C, sob agitação constante, durante 5 horas.

Após síntese a mistura reacional foi centrifugada e o produto sólido foi lavado com ácido clorídrico 1,0 mol/L (15 mL). O precipitado de tetra-amino-ftalocianina de zinco hidrocloreto formado, foi separado novamente por centrifugação, lavado com hidróxido de sódio 1,0 mol/L (10 mL) e mantido em agitação por 1 hora.

Após esse período o produto sólido foi separado novamente por centrifugação e lavado com água duas vezes para retirada das formas livres de hidróxido de sódio e cloreto de sódio. O complexo de zinco foi dissolvido em acetona e concentrado por rotaevaporação para dar o composto tetra-amino-ftalocianina de zinco.

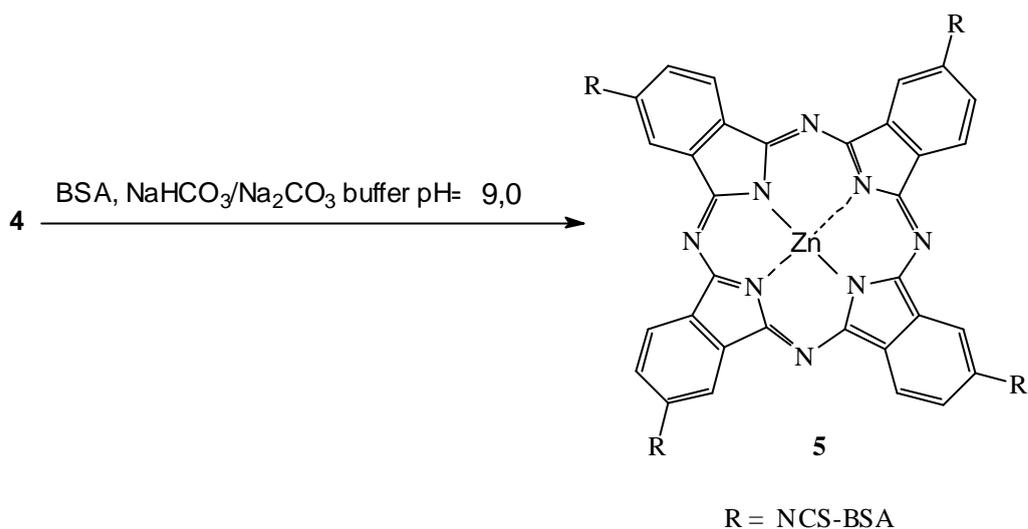
### 3.2.3 Preparação da tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco



Para preparação da tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco foram utilizados tetra-amino-ftalocianina de zinco (18,15mg; 0,028mmol), DMSO seco (20mL) e tiocarbonilpiridone (53,1mg; 0,22mmol). A reação foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e agitação constante por 2 horas, à temperatura ambiente. Após síntese a mistura reacional foi submetida à destilação à pressão reduzida para

remover o DMSO. Após destilação foi adicionado acetona ao produto sólido com consequente concentração por rotaevaporação para obtenção do composto tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco.

### 3.2.4 Conjugação da proteína BSA



Na preparação do bioconjugado foi feita uma solução estoque 8,1mg de tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco em 1 mL de DMSO (chamada solução A) e uma solução de 50mg BSA em 5mL de solução tampão carbonato pH=9,2 (chamada solução B).

Para reação foi utilizado 5 mL da solução B e 760  $\mu\text{L}$  da solução A. A reação foi mantida por 16 horas, sob agitação constante à temperatura ambiente livre de claridade. Após reação o bioconjugado foi purificado em coluna empacotada com sephadex-25. A solução contendo o bioconjugado foi concentrada por liofilização.

O bioconjugado foi preparado por quatro passos: Iniciou-se pela reação de nitroftalonitrila, com cloreto de amônia, acetato de zinco e hidróxido de sódio em solução de DMSO, originando o composto tetra-nitro-ftalocianina de zinco. O segundo passo foi dado pela redução do grupo nitro através do tratamento da tetra-amino-ftalocianina de zinco com sulfeto de sódio nonahidratado em solução aquosa a 50°C durante 5 horas, obtendo-se o composto tetra-amino-ftalocianina de zinco; o terceiro passo foi realizado reagindo o composto tetra-amino-ftalocianina de zinco com tiocarbonilpiridone em DMSO, obtendo-se o composto tetra-isotiocianato

ftalocianina de zinco . O último passo foi realizado pela reação do composto tetra- isotiocianato-ftalocianina de zinco com BSA diluído em DMSO e tampão carbonato, obtendo-se o bioconjugado de zinco ftalocianina.

### **3.3 Espectro de absorção**

Os espectros foram realizados em um Espectrofotômetro (UV-VIS, Cary 50 BIO-Varian Inc. Scientific Instruments, Australia) IP&D-UNIVAP, sendo a leitura realizada em cubetas de quartzo tipo 111-QS 10mm. A Pc- iso foi analisada numa concentração de 0,269 mg.mL<sup>-1</sup> diluída em DMSO e a Pc-BSA foi analisada numa concentração 4 mg.mL<sup>-1</sup> diluída em PBS.

Os espectros de infravermelho foram realizados no espectrofotômetro (Perkin Elmer FT-IR - spectrometer 2000) usando pastilhas de KBr.

### **3.4 Dosagem de proteína**

A quantificação da albumina no composto Pc-BSA foi feita utilizando-se o espectrofotômetro (ND-1000, Nanodrop® -Peqlab Biothechnologie GmbH Alemanha).

A Pc-BSA foi analisada numa concentração de 4 mg.mL<sup>-1</sup> diluída em PBS, foi utilizado como solução padrão uma solução de BSA numa concentração de 1mg.mL<sup>-1</sup> também diluída em PBS.

### **3.5 Linhagem celular**

Neste trabalho foram utilizados as linhagens de células HeLa (carcinoma de cólo de útero) e Hep-2 (carcinoma de laringe), obtidas do ATCC Adolfo Lutz, SP-Brasil.

### **3.6 Meio de cultura**

Foi utilizado o meio mínimo (Minimal Essential Medium -MEM), Gibco™, Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA). O conteúdo de cada frasco foi reconstituído em 1 litro de água ultra pura e adicionado bicarbonato de sódio (JTBaker™) e HEPES 10 mM (N-2 hidroxietilpiperazina, N-2 ácido etanosulfônico)

(Sigma™). O pH da solução foi ajustado para 7,1 e foi denominado de MEM incompleto. O meio usado nas culturas foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco™, Invitrogen Corp.), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco™, Invitrogen Corp.), aminoácidos e vitaminas e foi denominado de MEM completo. A solução foi esterilizada com membrana de poro 0,22 µm e conservada a 4°C.

O SFB a 10% é utilizado na complementação do meio de cultura por apresentar em sua composição insulina, hormônios e fatores de crescimento que aceleram o crescimento celular.

### **3.7 Crescimento e manutenção das culturas de células**

Partindo-se inicialmente de células estocadas em nitrogênio líquido, estas foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultura 25 cm<sup>2</sup> (BD Falcon, France) em MEM completo em câmara úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CKX41 e as células subcultivadas através de tripsinização quando a densidade celular formava uma monocamada confluenta.

As células crescidas em garrafas de culturas foram submetidas a tripsinização na qual a tripsina, uma protease secretada pelas células acinosas do pâncreas, digere as proteínas que formam a trama protéica que liga as células umas às outras. Para soltar as células, essas foram incubadas por 3 minutos com 2 mL de tripsina a 0,05% (Gibco™, Invitrogen Corp.), a seguir foram acrescidas de MEM incompleto e centrifugadas a 250 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em MEM completo para prosseguir com os experimentos *in vitro* ou prosseguir com a expansão em garrafas de cultura.

### **3.8 Fármaco fotossensibilizador e interação celular**

A Pc-iso foi dissolvida em DMSO e mantida a temperatura ambiente enquanto que a Pc-BSA foi dissolvida em PBS e mantida em geladeira, ambas no escuro. Para os ensaios de interação celular, as células Hep-2 e HeLa (5x10<sup>5</sup> céls/mL) foram cultivadas em placas de 24 poços (BD Falcon, France) acrescidas de lamínulas redondas estéreis contendo meio de cultura completo e incubadas por

toda a noite para permitir completa adesão. No dia seguinte as células foram lavadas com PBS e incubadas com Pc-iso nas concentrações ( $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $4,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e com Pc-BSA nas concentrações ( $1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). As células foram incubadas por 1 hora, em seguida lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com meio MEM completo por 1, 6, 12 e 24 horas. No final de cada período de incubação as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos no escuro. Os experimentos foram feitos em duplicata.

### **3.9 Microscopia de fluorescência**

Ao término dos períodos de incubação, as lâminas contendo as células fixadas foram submetidas à análise pelo microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico Leica MPS-30, utilizando o filtro de excitação de aproximadamente 358 nm e emissão 461nm. Cada linhagem celular foi fotografada após os diferentes períodos de incubação e diferentes concentrações de Pc-iso e Pc-BSA utilizadas, afim de observar a metabolização dos compostos pelas culturas celulares.

### **3.9 MTT- Teste de citotoxicidade celular**

O teste de citotoxicidade avaliou as culturas de células HeLa em intervalos de tempo de 1 e 24 horas com o método de MTT [brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium].

O teste de MTT foi realizado de acordo com o seguinte procedimento: após a remoção do MEM, cada poço recebeu 80  $\mu\text{L}$  de MTT para obter uma concentração final de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . As células foram deixadas por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

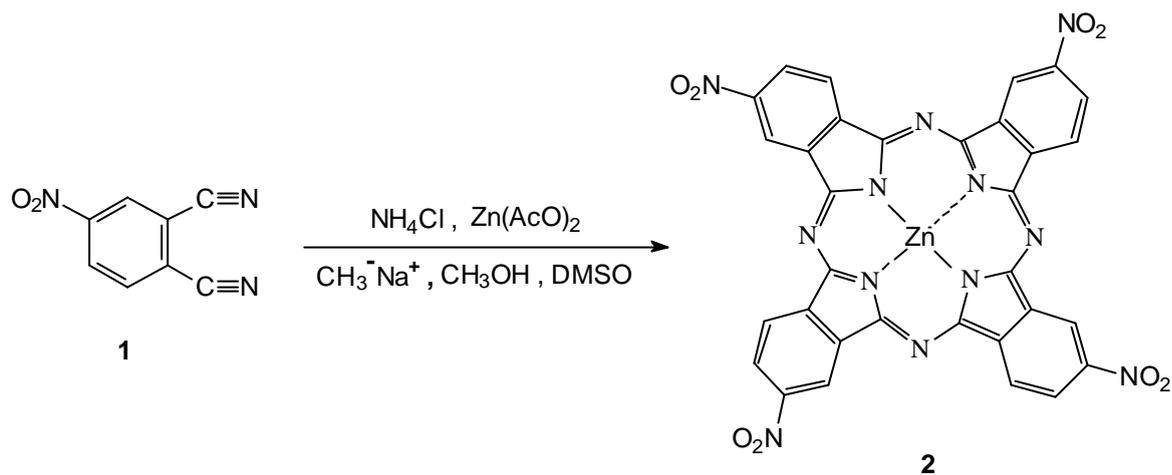
Sobre o precipitado de formazana foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de DMSO em cada poço. A placa foi mantida sob agitação constante por 30 minutos para solubilização dos cristais de formazana.

A concentração de cristais foi quantificada espectroscopicamente por meio de um leitor de microplacas ( ELISA- SpectraCount) em um comprimento de onda igual a 570 nm.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados das preparações das ftalocianinas

#### 4.1.1 Preparação da tetra-nitro-ftalocianina de zinco (2)



Foi obtido um rendimento de 21% após a purificação. A caracterização foi feita por espectroscopia no infravermelho com pastilhas de KBr e apresentou as bandas em 1609, 1512, 1487, 1285 e 1166 cm<sup>-1</sup>. Os compostos nitro mostram absorções provenientes dos estiramentos assimétricos e simétricos do grupo NO<sub>2</sub>. A absorção assimétrica provoca uma banda forte em 1661- 1499 cm<sup>-1</sup>. A absorção simétrica ocorre entre 1389 e 1259 cm<sup>-1</sup>.

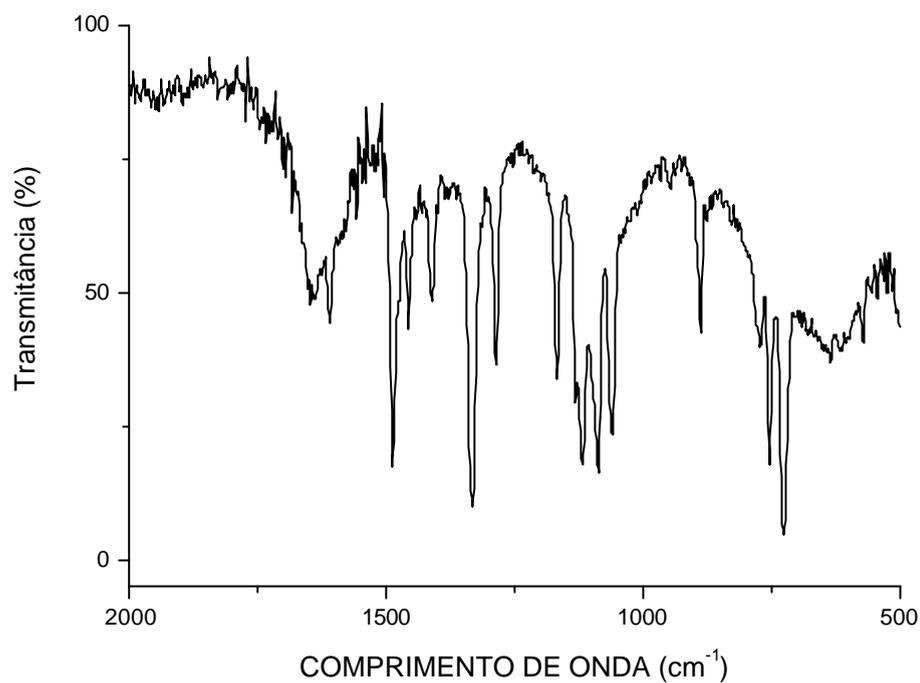
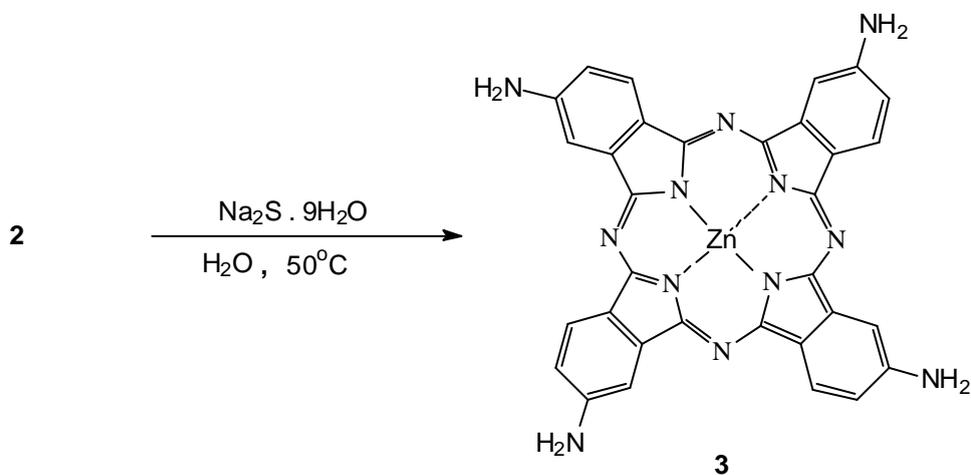


Figura 04 Espectroscopia no infravermelho do composto tetra-nitro-ftalocianina de zinco.

A espectroscopia no ultravioleta foi feita usando uma solução do fármaco fotossensibilizador em DMSO apresentando como sinal mais intenso uma banda de absorção em 700nm

#### 4.1.2 Preparação da tetra-amino-ftalocianina de zinco (3)



Esta síntese ocorreu pela redução dos derivados de nitro, usando sulfeto de sódio nonaidratado.

Foi obtido um rendimento de 17% após a purificação. A caracterização foi feita por espectroscopia no infravermelho com pastilhas de KBr e apresentou as bandas em 3279, 1602, 1496, 1400, 1106, 887  $\text{cm}^{-1}$ . O grupo  $\text{NH}_2$  apresenta uma absorção em 3550-3300  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento assimétrico) e 3450-3250  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento simétrico). A banda correspondente à deformação angular simétrica no plano de NH é observada na região de 1650-1580  $\text{cm}^{-1}$ . As aminas aromáticas produzem uma absorção forte de deformação angular de C-N em 1342-1266  $\text{cm}^{-1}$  e deformação angular simétrica fora do plano de NH, 909-666  $\text{cm}^{-1}$ .

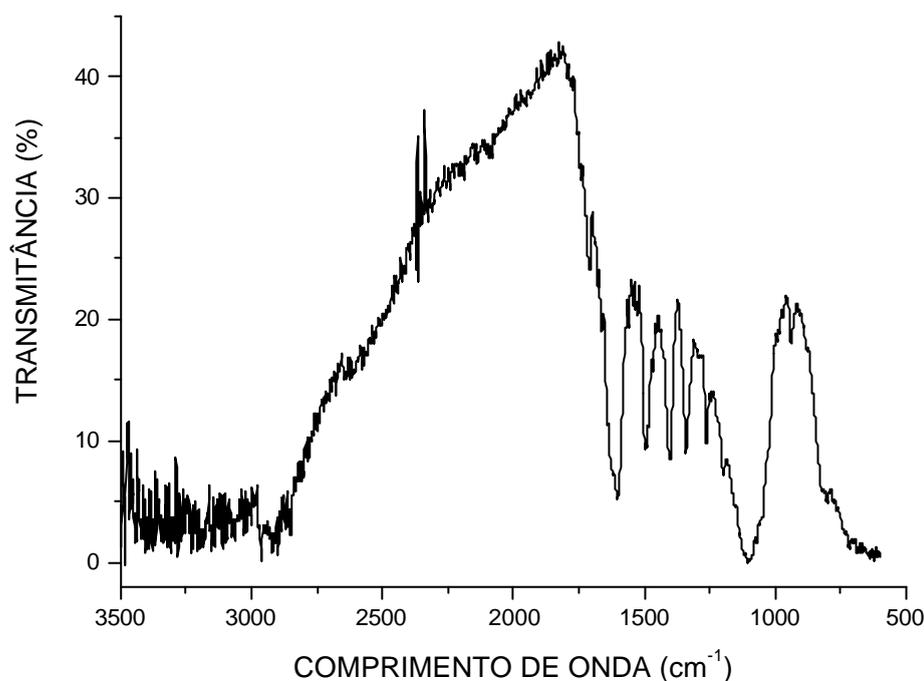


Figura 05 Espectroscopia no infravermelho do composto tetra-amino-ftalocianina de zinco.

A espectroscopia no ultravioleta foi feita usando uma solução do fármaco fotossensibilizador em DMSO apresentando como sinal mais intenso uma banda de absorção em 742nm.

### 4.1.3. Preparação da tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco (4)

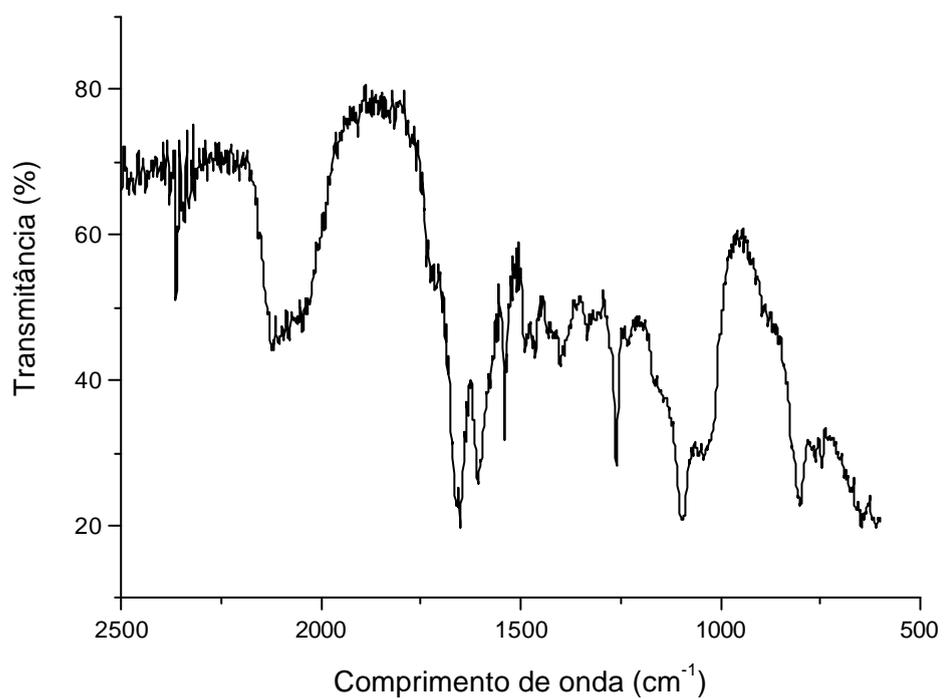
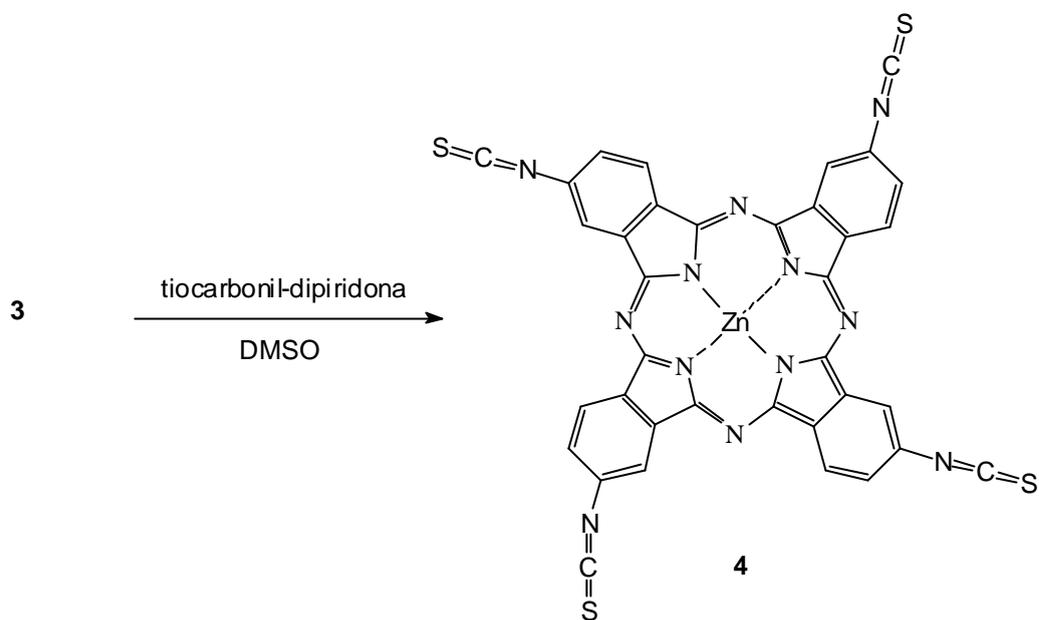
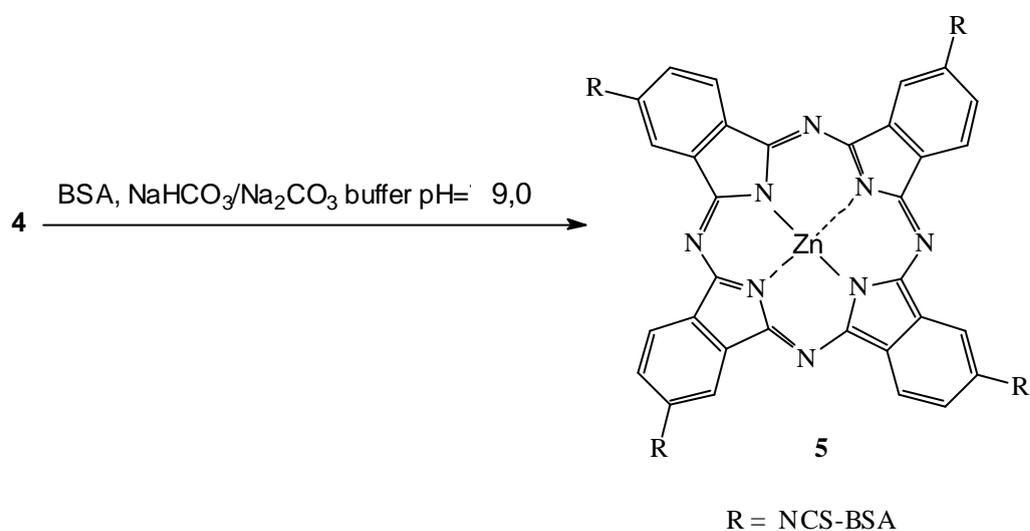


Figura 06 Espectroscopia no infravermelho do composto tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco.

Foi obtido um rendimento de 40% após a purificação. A caracterização foi feita por espectroscopia no infravermelho com pastilhas de KBr e apresentou as bandas em 2135, 1652, 1606, 1540  $\text{cm}^{-1}$ . A banda característica de  $\text{N}=\text{C}=\text{S}$  é encontrada na região de 2000- 2200  $\text{cm}^{-1}$ . A espectroscopia no ultravioleta foi feita usando uma solução do fármaco fotossensibilizador em DMSO apresentando como sinal mais intenso uma banda de absorção em 700nm.

#### 4.2 Conjugação da proteína BSA (5)



O último passo foi realizado pela reação do composto tetra-isotiocianato ftalocianina de zinco com BSA diluído em DMSO e tampão carbonato, obtendo-se o bioconjugado de zinco ftalocianina.

O espectro de absorção do bioconjugado e de seu precursor foi investigado por um espectrofotômetro UV/VIS, apresentando dois sinais (ombro) na região de 650-700 nm e 700 nm respectivamente.

#### 4.3 Espectro de absorção

O espectro mostra a absorção dos fármacos fotossensibilizadores e dos respectivos solventes. Na figura 07 podemos observar um sinal (absorbância) mais intenso da Pc-iso (azul) do que a Pc-BSA (verde), na região de 700 nm. A Pc-BSA apresenta um espectro formado por dois sinais (ombro) entre 650 e 700 nm, característico de ftalocianinas em solução muito polar. Os solventes PBS (vermelha) e o DMSO (preta) não interferiram nas medidas.

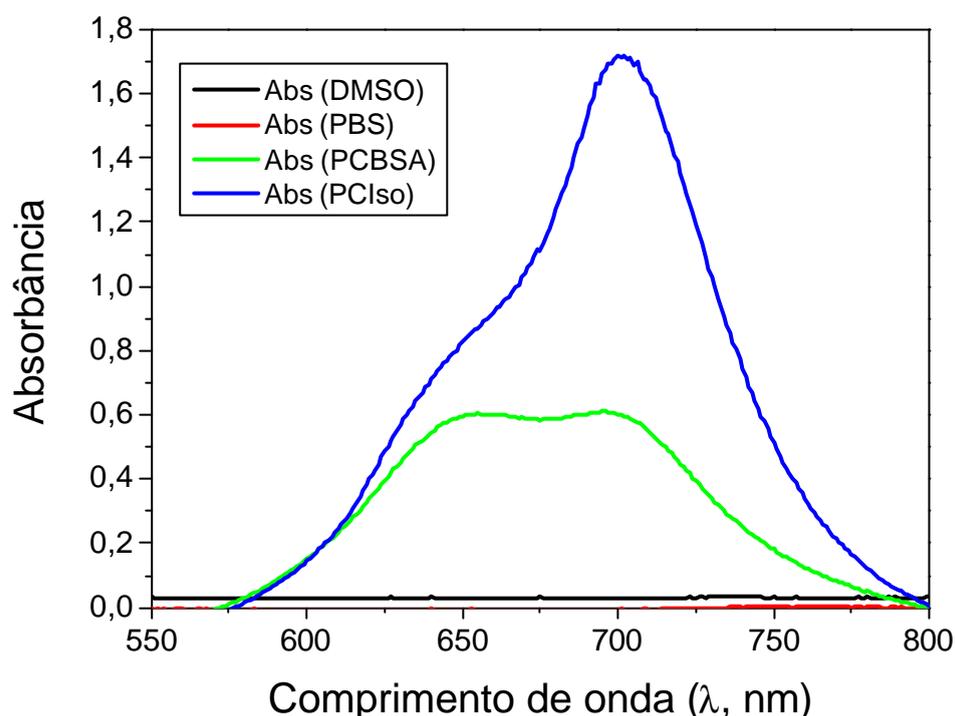


Figura 07. Espectro de absorção UV-VIS do composto Pc-iso dissolvido em DMSO ( $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e do composto Pc-BSA dissolvido em PBS ( $0,269 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

#### 4.4 Dosagem de proteína

O espectro (figura 08) mostra a absorbância da Pc-BSA e calcula a quantidade de proteína presente na ftalocianina de zinco conjugada. Para análise foram feitas três soluções: solução de PBS (branco), BSA  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  (solução padrão) e Pc-BSA  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$ , para cada solução foi utilizado  $2 \mu\text{L}$  e a leitura foi feita no espectrofotômetro ND-1000, (Nanodrop<sup>®</sup>) em 280 nm.

O composto Pc-iso foi ligado covalentemente a BSA obtendo-se um bioconjugado na razão 3:1 (corante: proteína). Resultado similar foi observado por Hamblin; Miller; Ortel (2000).

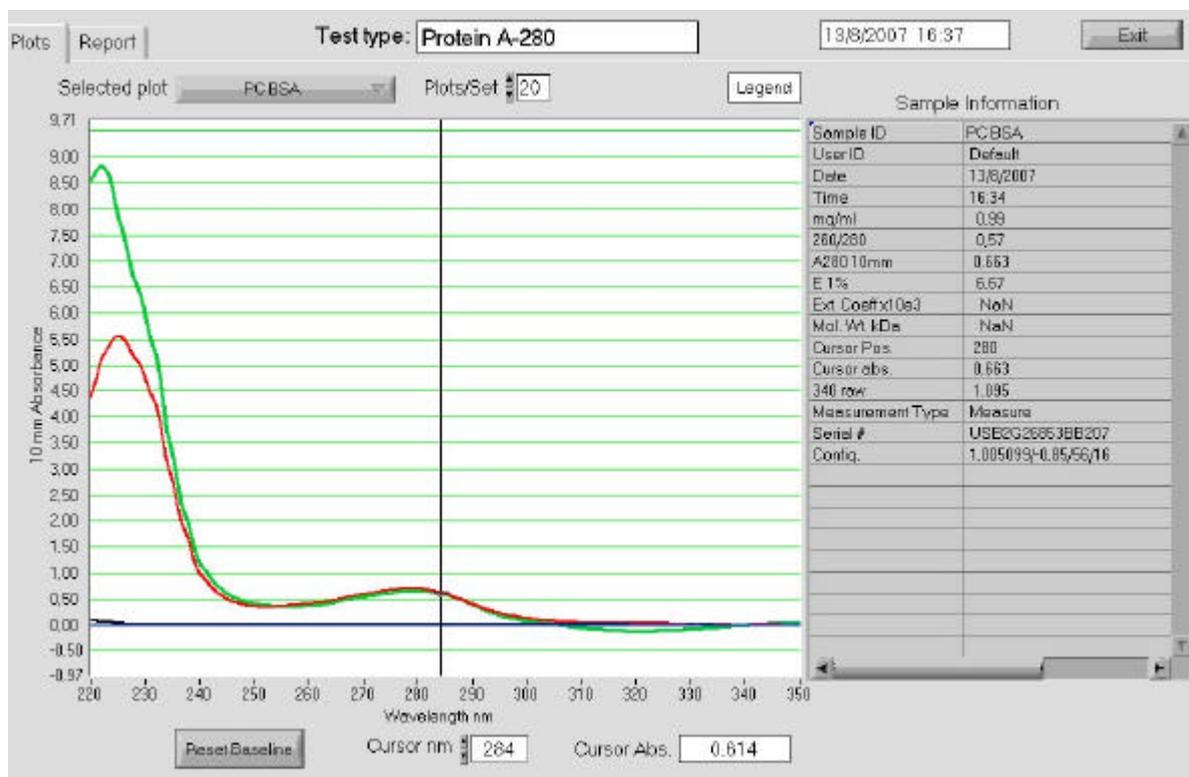


Figura 08. Dosagem da albumina no espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop®). A Pc-BSA (linha verde) foi medida numa concentração de  $4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluída em PBS, utilizou-se como padrão solução de BSA (linha vermelha) numa concentração de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluída em PBS e como branco PBS.

#### 4.5 Microscopia de fluorescência

Para avaliar a interação da Pc-iso e da Pc-BSA, nós utilizamos as linhagens de células HeLa e Hep-2.

Os resultados da microscopia de fluorescência mostram que a Pc-iso quando incubada nas concentrações de  $0,8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  nas linhagens de células Hep-2, interage de uma maneira uniforme em ambas as concentrações, como demonstrado na figura 09. Na primeira hora foi possível observar o aparecimento de uma alta fluorescência na região nuclear (figura 09a e 09e). Após 6 horas de incubação uma maior fluorescência foi observada no citoplasma (figura 09b

e 09f). Após 12 e 24 horas uma redução no padrão da fluorescência foi observada, ocorrendo à presença de vacúolos após 12 horas (figura 09 c, 09 g-seta), os quais começaram a diminuir a partir de 24 horas de incubação (figura 09h- seta).

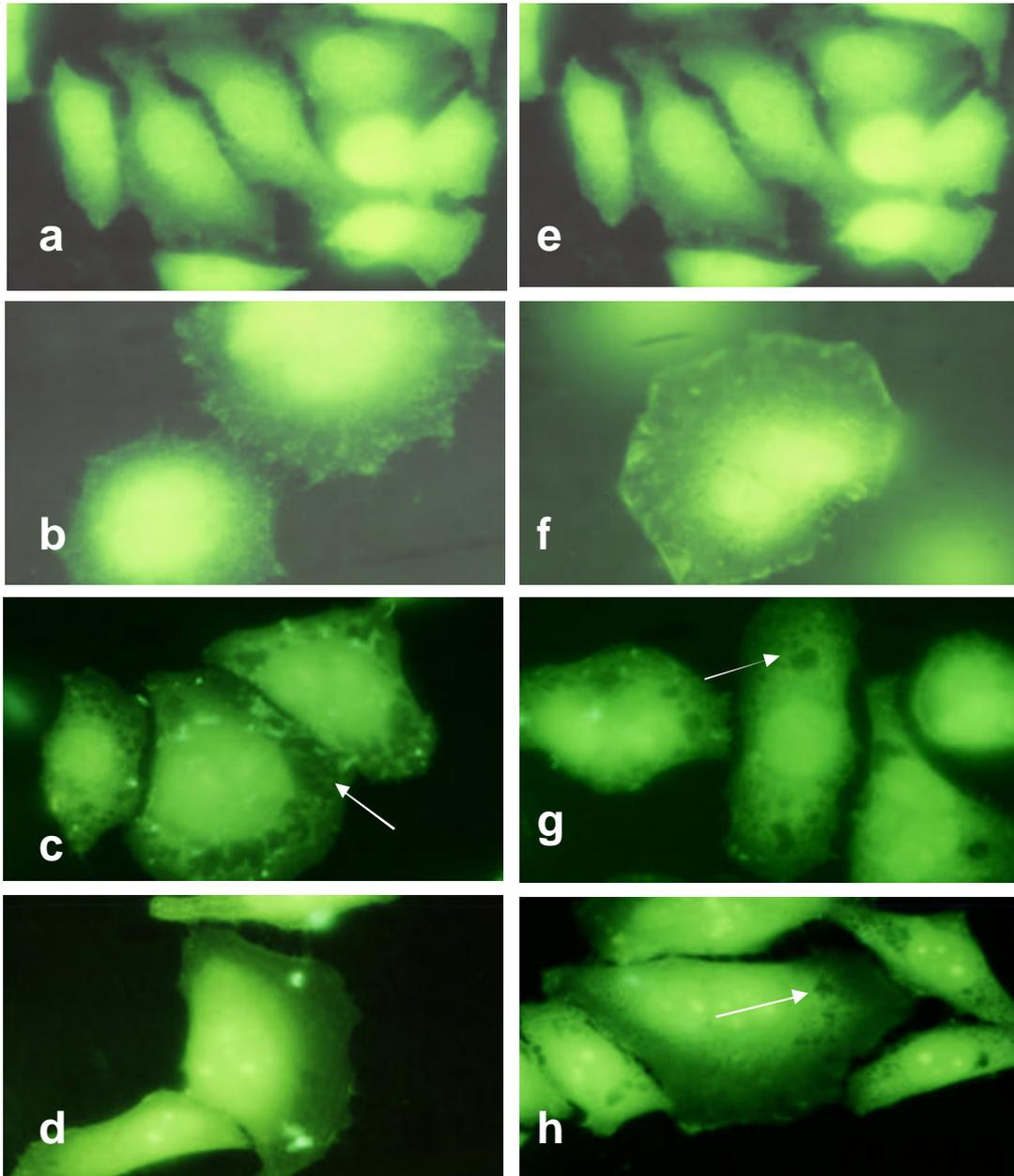


Figura 09 Linhagens de células Hep-2 incubadas com a Pc-iso diluída em DMSO nas concentrações de  $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivamente: (a/e) 1h, (b/f) 6h, (c/g) 12h, (d/h) 24h.

As análises do composto Pc-iso quando incubadas nas concentrações de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> e 4 mg.mL<sup>-1</sup> mostraram que nas linhagem de células HeLa o composto Pc-iso distribuiu-se uniformemente entre as células, não observando o aparecimento de vacúolos em nenhuma hora de incubação., podendo ser notado a ausência de vacúolos no citoplasma.

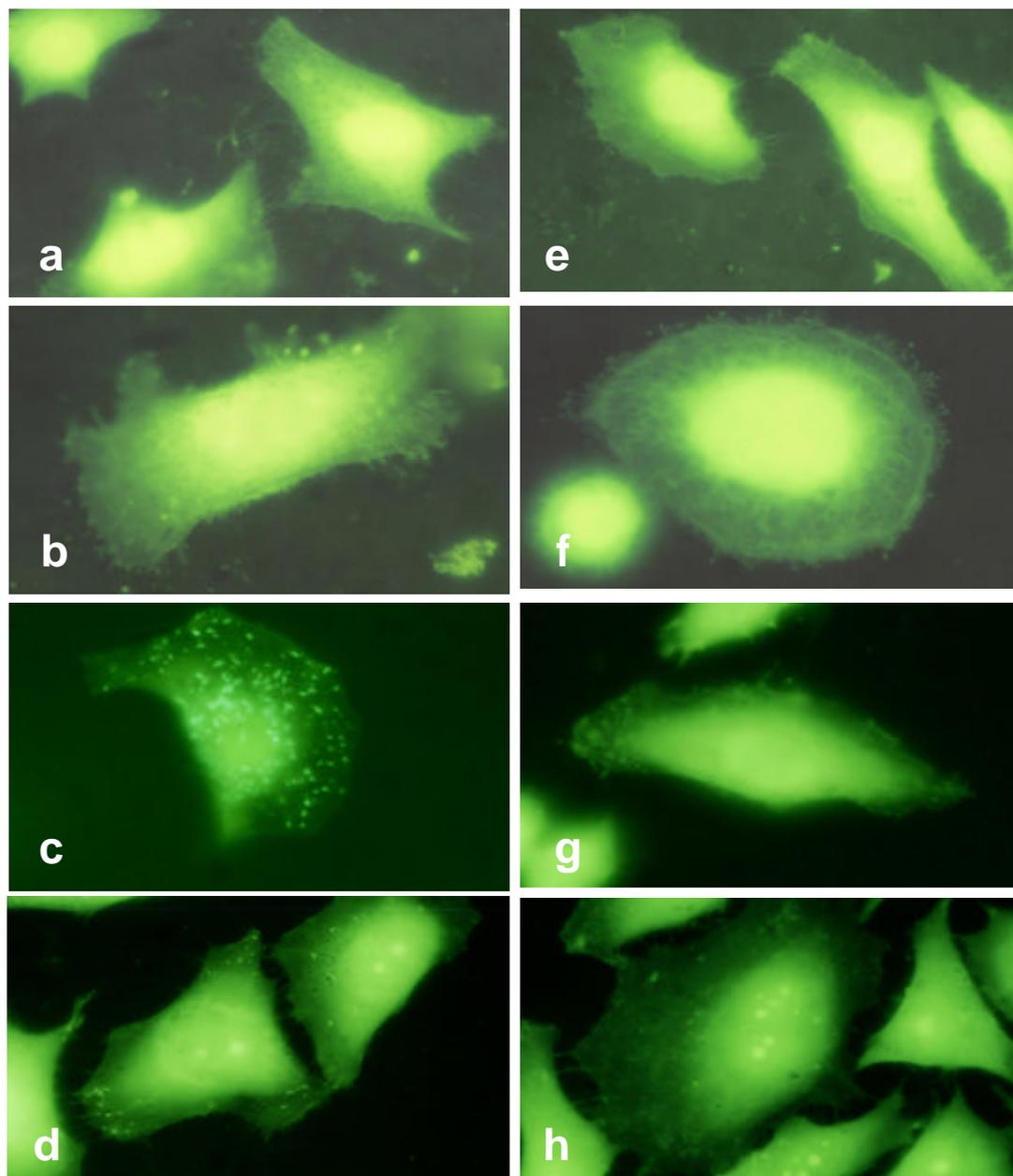


Figura 10 Linhagens de células HeLa incubadas com a Pc-iso diluída em DMSO nas concentrações de  $0,8 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $4 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivamente: (a/e) 1h, (b/f) 6h, (c/g) 12h, (d/h) 24h.

As análises de microscopia de fluorescência para a Pc-BSA quando incubadas com as células Hep-2 nas concentrações de  $1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$  mostraram que as células interagem de uma maneira uniforme em ambas as concentrações, como demonstrado na figura 11. Após 1 hora de incubação foi possível observar uma alta fluorescência na região nuclear (figura 11a e 11e). Após 6 horas de incubação uma maior fluorescência foi observada no citoplasma (figura 11b e 11f). Após 12 horas foi observada a presença de vacúolos (figura 11c- 11g-seta), os quais diminuem após 24 horas.

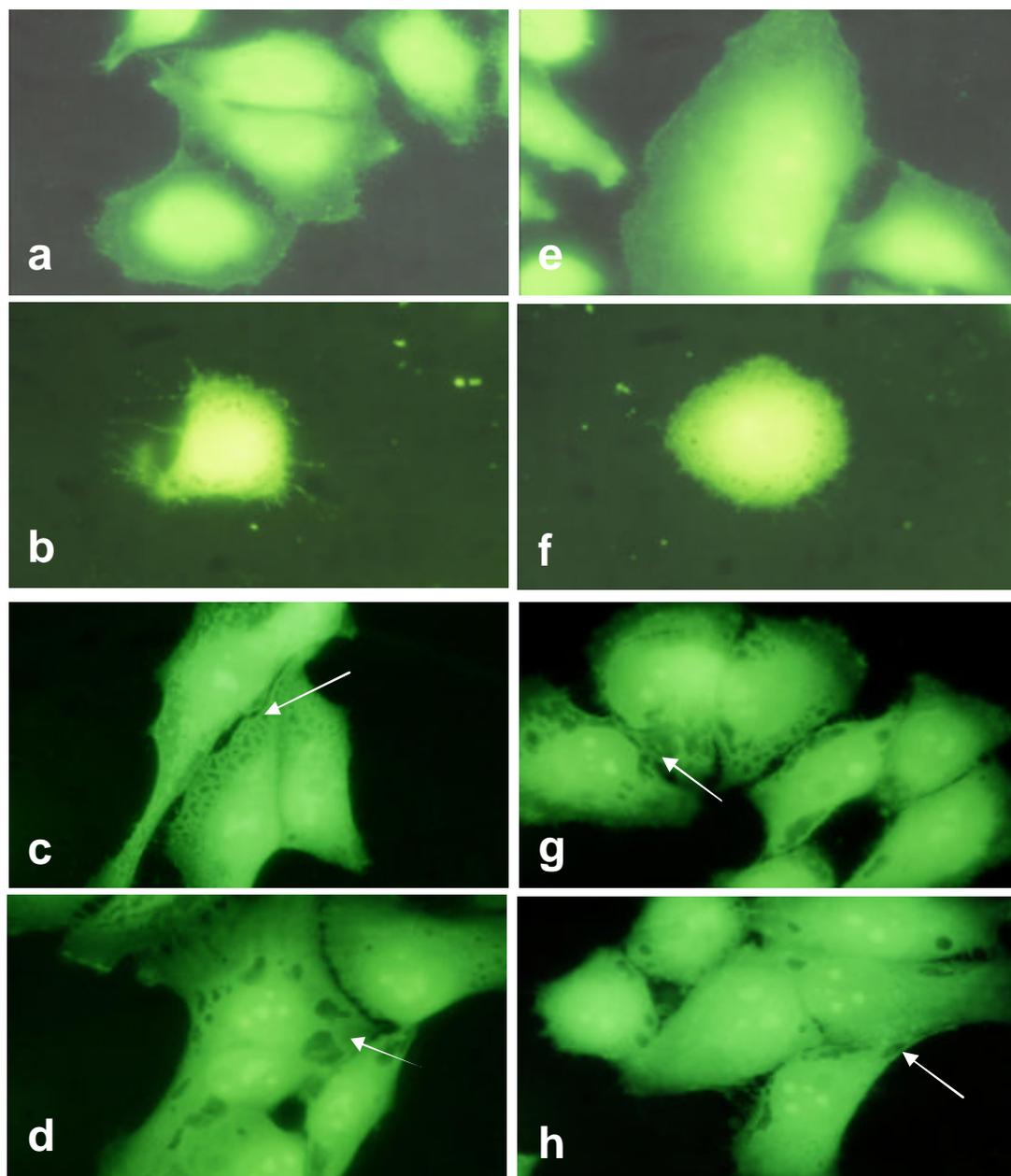


Figura 11 Linhagens de células Hep-2 incubadas com a Pc-BSA diluída em PBS nas concentrações de 1,4 mg.mL<sup>-1</sup> e 8 mg.mL<sup>-1</sup> respectivamente: (a/e) 1h, (b/f) 6h, (c/g) 12h, (d/h) 24h.

Para o composto Pc-BSA quando incubado com as células HeLa nas concentrações de  $1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$  observou-se que o bioconjugado distribuiu-se uniformemente entre as células, notando-se o aparecimento de vacúolos já na primeira hora de incubação (figura 12a e 12e- seta), os quais permanecem após 6 horas (figura 12b e 12f- seta). Após 12 e 24 horas de incubação não há presença de vacúolos, mas observa-se a migração do bioconjugado para região perinuclear.

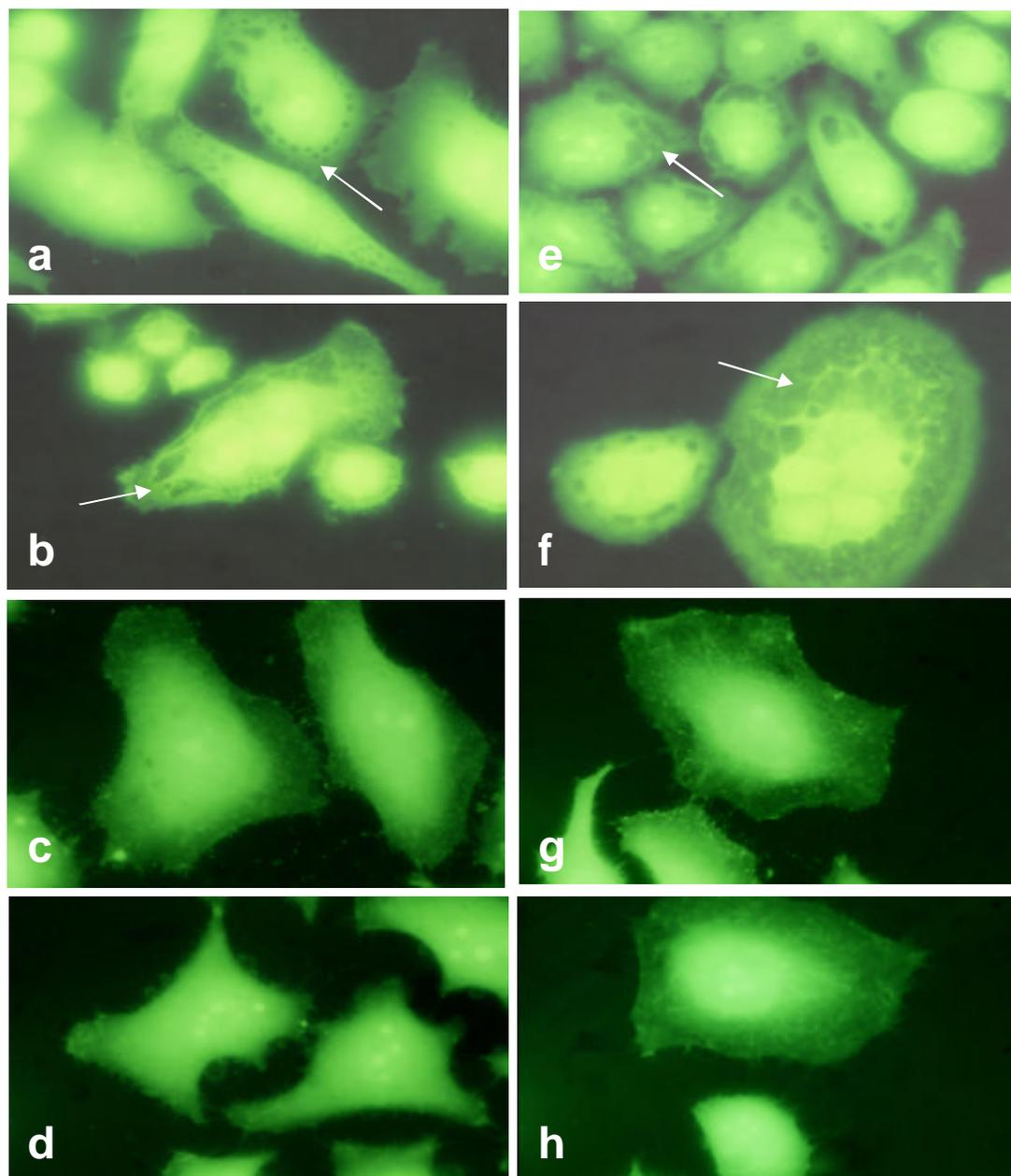


Figura 12 Linhagens de células HeLa incubadas com a Pc-BSA diluída em PBS nas concentrações de  $1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $8 \text{ mg.mL}^{-1}$  respectivamente: (a/e) 1h, (b/f) 6h, (c/g) 12h, (d/h) 24h.

#### **4.6 MTT- Teste de citotoxicidade celular**

Foram analisados também a citotoxicidade dos compostos: Pc-iso e Pc-BSA através do teste de MTT.

Os resultados obtidos mostraram que o composto Pc-BSA, mesmo em diferentes concentrações, (figura 14), não alterou a viabilidade celular, embora tenha sido observada uma atividade mitocondrial mais intensa das células HeLa na sua presença. A variação da atividade mitocondrial ilustrada no gráfico não foi significativa de acordo com o teste de ANOVA 2way ( $P > 0,05$ ). Os resultados ilustrados do composto Pc-iso (figura 13) quando comparados com o composto Pc-BSA também não foram significativos ( $P > 0,05$ ), mostrando que ambos os compostos não são tóxicos para as células mesmo após 24 horas de incubação. No entanto, se a concentração for aumentada, a atividade mitocondrial também aumenta, porém esse aumento não é significativo.

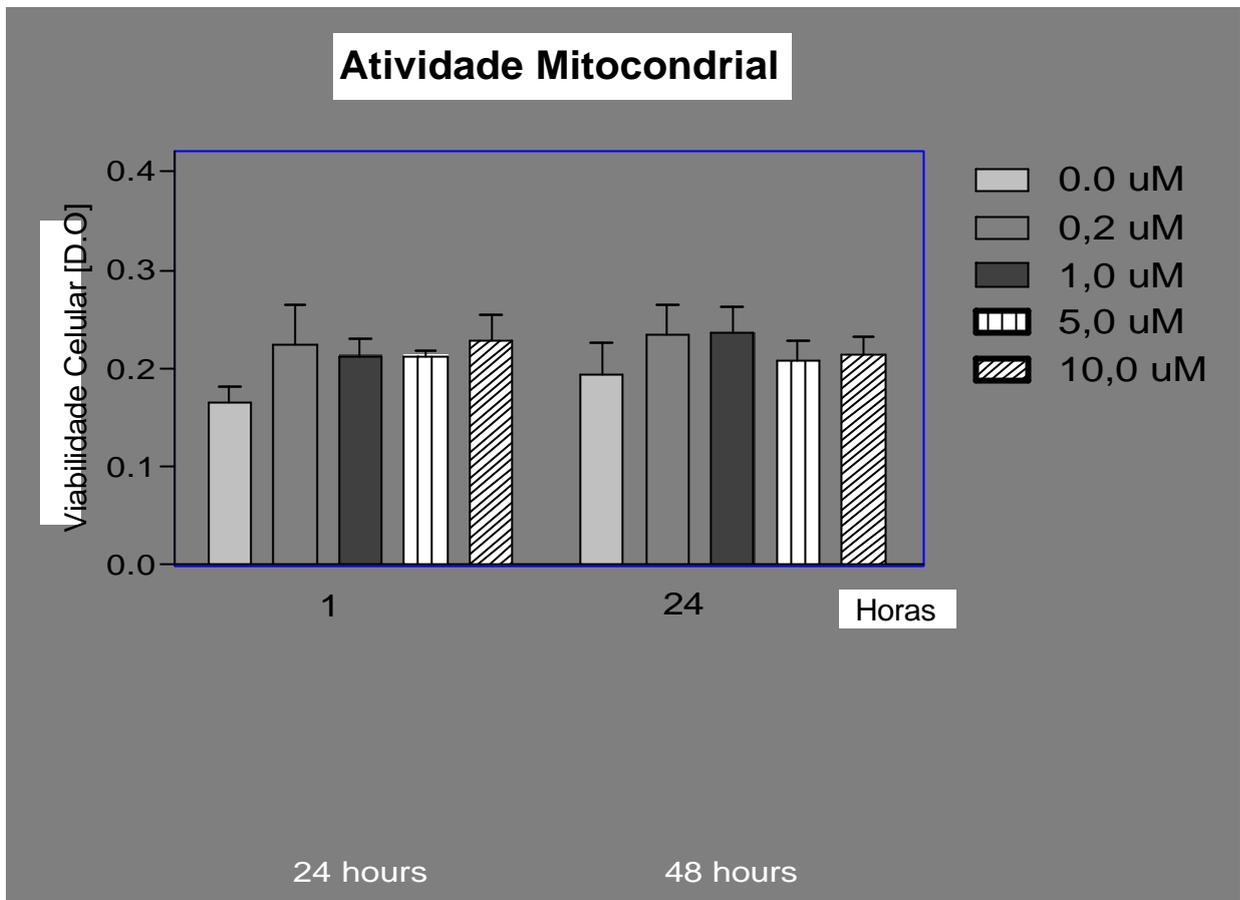


Figura 13 Atividade Mitochondrial medida por ensaio de MTT. Média e Desvio Padrão dos grupos nos tempos 1 e 24h de incubação com o composto Pc-iso em cultura de células HeLa . Sendo a variação da atividade mitocondrial analisada de acordo com o teste de ANOVA 2way ( $P > 0,05$ ).

### Atividade Mitocondrial

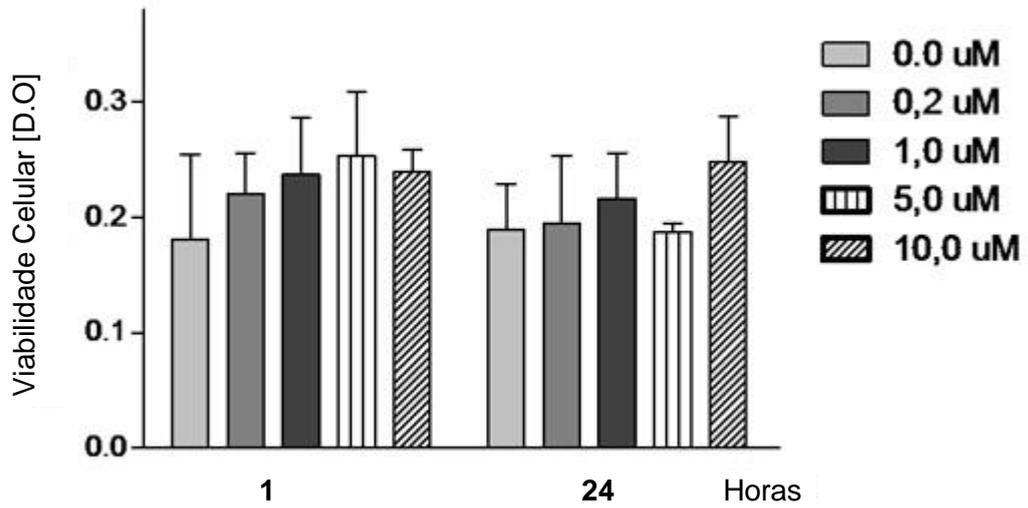


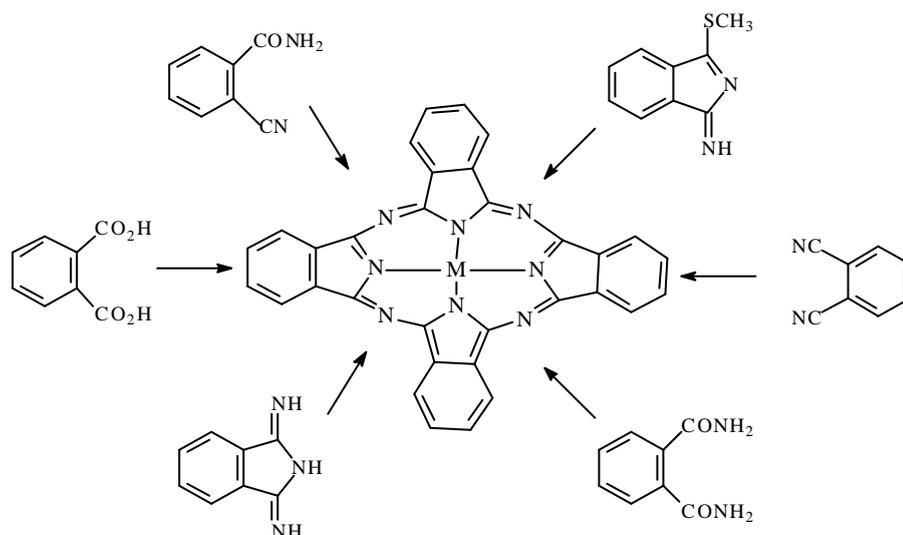
Figura 14 Atividade Mitocondrial medida por ensaio de MTT. Média e Desvio Padrão dos grupos nos tempos 1 e 24h de incubação com o composto Pc-BSA em cultura de células HeLa. Sendo a variação da atividade mitocondrial analisada de acordo com o teste de ANOVA 2way ( $P > 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÕES

Bioconjugados de ftalocianinas vêm sendo extensivamente estudados para melhorar as propriedades dos fármacos fotossensibilizadores. Esta estratégia é baseada na habilidade natural que esses compostos apresentam de se localizar entre certos compartimentos celulares, tais como: mitocôndria, retículo endoplasmático, lisossomos ou complexo de Golgi (VAZQUEZ *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Os métodos mais comuns de preparação de ftalocianinas envolvem uma reação de condensação do ácido ftálico ou de seus derivados, como pode ser mostrado pelo Esquema II (Ali, *et al.*, 1988).

Esquema II

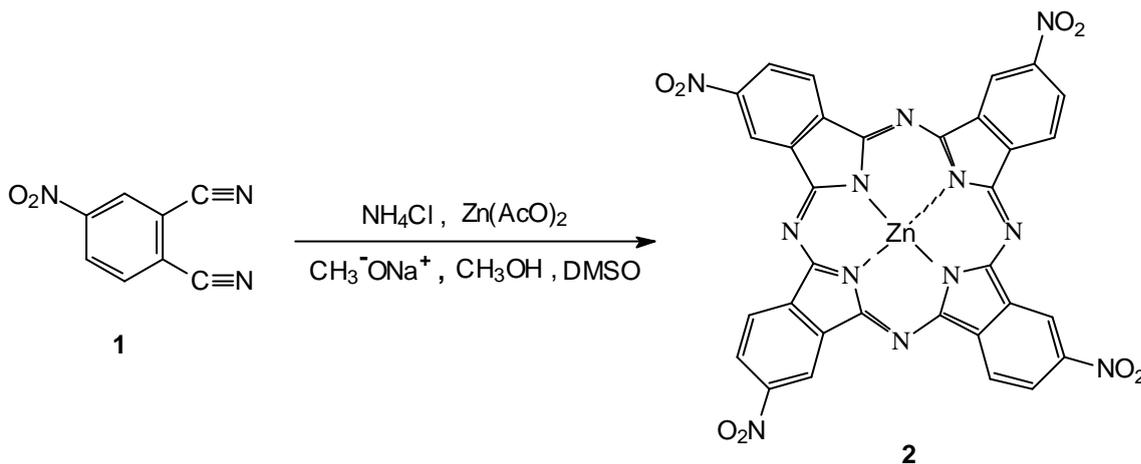


Estudos mostram que as propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente influenciadas pelo íon metálico central (M). Complexação de ftalocianinas com metais de transição levam à formação de corantes com pequeno tempo de vida triplete, o que confere uma grande limitação para o uso na terapia fotodinâmica (Ali,*et al.*, 1988).

Íons diamagnéticos ( $Zn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Ga^{+3}$ ), por outro lado, conduzem a altos rendimentos triplete e longos tempos de vida, o que aumenta a fototoxicidade destes

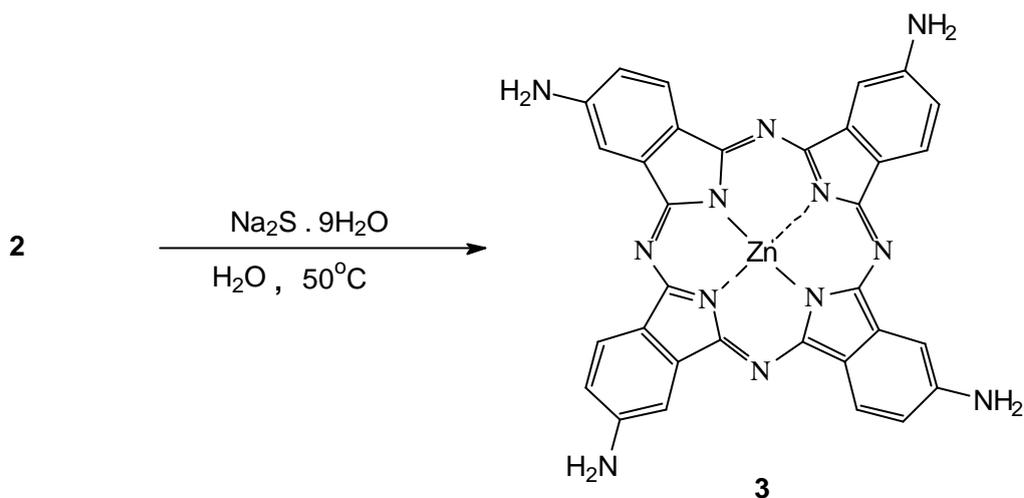
compostos o que nos fez optar pelo uso do zinco como átomo central da ftalocianina estudada.

A preparação de nosso composto também partiu do método exposto no esquema II, ou seja, formação do anel da ftalocianina usando o composto comercial nitro-ftalonitrila (1) como material de partida.



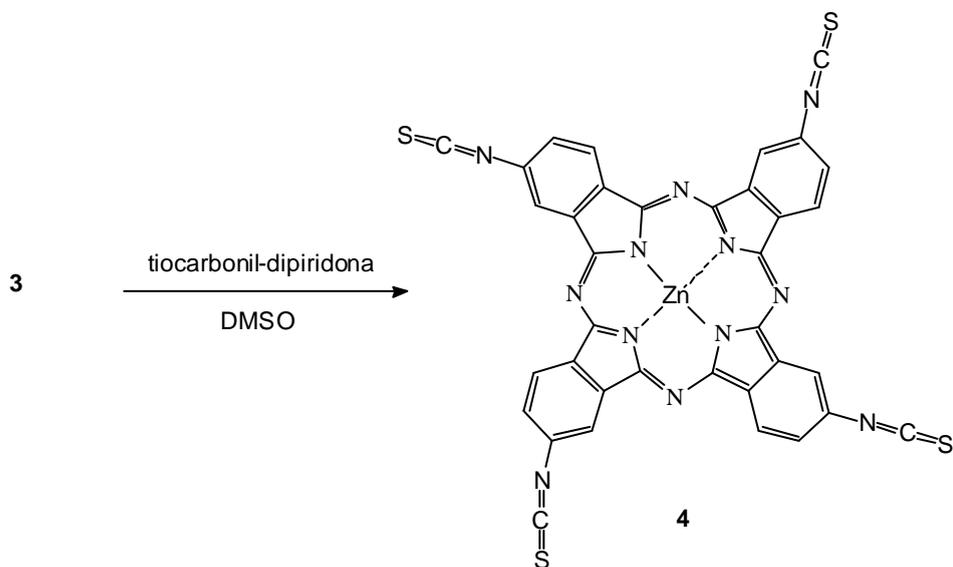
Em uma primeira etapa a 4-nitroftalonitrila foi misturada com cloreto de amônio, acetato de zinco, hidróxido de sódio e metóxido de sódio para formar, depois de 4 horas, a zinco tetra-nitro-ftalocianina. O metóxido de sódio foi preparado imediatamente antes do seu uso dado a sua reatividade com água.

O processo foi executado em 4 horas de refluxo para fornecer 21% da tetra-nitro-ftalocianina de zinco. A purificação do composto foi realizada pela remoção do material de partida que é muito solúvel em solventes orgânicos como o etanol, ao passo que a ftalocianina formada é praticamente insolúvel neste mesmo solvente. O espectro de absorção no infravermelho aponta para um composto que possui o grupo amino substituído (1602, 1512, 1487, 1285, 1166 cm<sup>-1</sup>) e a presença de outros sinais característicos de ftalocianina.

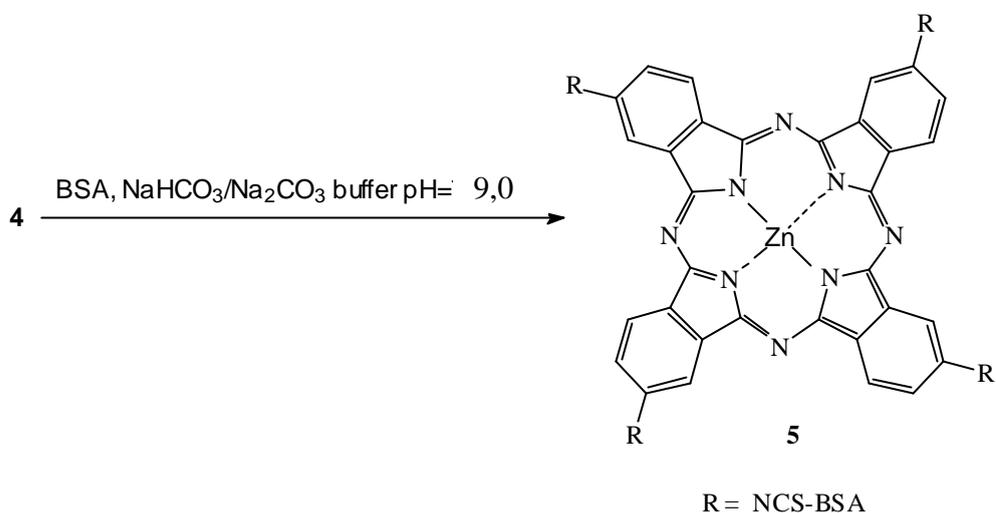


A obtenção da tetra-amino-ftalocianina de zinco ocorreu através da redução da tetra-nitro-ftalocianina de zinco, produzida na etapa anterior, utilizando sulfeto de sódio nona-hidratado.

Após a reação de redução o material bruto foi separado por centrifugação e a mistura reacional foi tratada com HCl. O precipitado formado foi separado por centrifugação, tratado com NaOH e centrifugado novamente para a separação do produto sólido, que foi lavado com água até a remoção total do hidróxido de sódio e cloreto de sódio formado. No caso da tetra-amino-ftalocianina de zinco o complexo de zinco parece sofrer degradação quando é esquentado na presença de solução de hidróxido de sódio (ACHAR, *et al.*, 1987).



A tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco foi obtida a partir da reação da tetra-amino-ftalocianina de zinco com o reagente tiocarbonil-dipiridona em agitação de 2 horas.



Finalmente, o bioconjugado foi preparado pela reação da tetra-isotiocianato-ftalocianina de zinco com uma solução da proteína. A purificação do bioconjugado foi realizada em coluna de filtração sephadex 25 utilizando tampão fosfato. Após purificação o bioconjugado foi submetido ao processo de liofilização.

É conhecido que a purificação e caracterização dos compostos orgânicos obtidos de uma reação química são, em sua maioria, mais problemáticas do que os próprios métodos utilizados para obtê-los. No caso específico dos derivados de porfirinas (incluídas também as ftalocianinas e naftalocianinas) essa dificuldade é acentuada devido aos inúmeros subprodutos formados durante a reação final de ciclização.

Algumas técnicas de purificação, que têm sido empregadas com sucesso em outros trabalhos envolvendo derivados de porfirinas, foram empregadas em nossos procedimentos (GORMAN, 1992)

Para os resultados do espectro de absorção foi possível observar uma faixa de absorção do bioconjugado entre 650-700 nm, enquanto que sua precursora apresenta pico máximo de 700 nm. O comprimento de onda não definido do bioconjugado, sugere uma possível agregação das moléculas quando em soluções aquosas ou solventes polares. Embora o estado de agregação do bioconjugado possa diminuir a produção de oxigênio singlete, isto não interfere na fotoatividade

biológica porque após endocitose os bioconjugados, geralmente se localizam nos lisossomos. BRASSEUR *et al.*, (1999) relataram que a agregação de bioconjugados em soluções aquosas é proporcional a hidrofobicidade do Fs e que esses bioconjugados são liberados, após a degradação da proteína, pelos lisossomos com diminuição da agregação do Fs. Também foi realizado espectro de emissão, porém os resultados não foram satisfatórios, visto que o bioconjugado sintetizado nessa pesquisa apresenta pH 8 e segundo VAZQUEZ *et al.*, (2007) um rendimento maior de fluorescência para as ftalocianinas de zinco conjugadas a peptídeos foram encontrados em pH 5.

Após espectroscopia a Pc-BSA e a Pc-iso foram submetidos a testes em linhagens de células HeLa e Hep-2 para comparar a eficácia do bioconjugado em relação ao seu precursor.

A interação da Pc-iso e da Pc-BSA entre as linhagens de células HeLa e Hep2 foram investigadas por microscopia de fluorescência. Os resultados do bioconjugado mostraram que a linhagem de célula Hep-2 mantém a Pc-BSA em sua superfície, sugerindo uma endocitose somente após 12 horas de incubação (figuras 09 e 11 ), os vacúolos observados eram menores e quase ausentes após 24 horas de incubação. Ao comparar células Hep-2 com células HeLa, nós podemos observar uma intensa endocitose logo na primeira hora de incubação, ocorrendo uma fusão desses vacúolos após 6 horas de incubação (figuras 10 e 12). A Pc-iso e a Pc-BSA mesmo quando incubadas em diferentes concentrações, mostraram um comportamento similar, porém nota-se que a quantidade de vacúolos é maior quando a concentração da Pc-BSA também é maior.

A grande quantidade de vacúolos sugere a presença de receptores para albumina na superfície dessas células. As células HeLa provavelmente expressam grande quantidade de receptores para albumina humana (HSA). Uma vez que a BSA apresenta uma homologia de aproximadamente 90% em relação à HSA, é esperado que nosso bioconjugado também possa ser processado por este tipo de receptor. Sua presença pode justificar a rápida interação do bioconjugado, logo na primeira hora de incubação pelas células HeLa e uma interação mais tardia do mesmo composto pelas células Hep-2 (SUTTON *et al.*, 2002).

Foi observado que para ftalocianinas de zinco (VAZQUEZ *et al.*, 2007; WOOD; HOLROYD; BROWN, 1997), as proteínas dos bioconjugados são degradadas preferencialmente pelos lisossomos, e que após a exposição à luz,

liberam a Pc diminuindo o estado de agregação da droga, para então se localizar em outras organelas tais como: núcleo, R.E ou complexo de Golgi. Segundo VAZQUEZ *et al.*, (2007) mesmo colocando uma seqüência de nucleoplasmina nos conjugados de ftalocianina, o núcleo não foi o principal sítio de localização da droga. Uma maior concentração do conjugado apareceu nos lisossomos, sugerindo uma liberação da droga pelas organelas após exposição da luz.

De acordo com Urizzi *et al.*, (2001) e Brasseur *et al.*, (1999) bioconjugados podem induzir uma mudança conformacional da proteína limitando o acesso da droga ao receptor. No entanto, mesmo que o receptor não reconheça o bioconjugado, os macrófagos expressam receptores do tipo “scavenger” que podem capturar e degradar diversas proteínas com subsequente liberação do Fs para que esse se localize em outros compartimentos celulares (HAMBLIN; MILLER; ORTEL, 2000). Este tipo de receptor pode ainda promover um aumento no processo de endocitose com consequente localização nos lisossomos.

A incorporação de nossa ftalocianina conjugada, Pc-BSA, provavelmente ocorre através de endocitose, o que resultou num grande número de vacúolos como podemos observar nas linhagens de células HeLa (figura 07 e 09).

Com o objetivo de determinar a toxicidade da Pc-iso e da Pc-BSA, nós submetemos as células HeLa ao ensaio de MTT por no mínimo 1 hora até 24 horas de incubação. A técnica de MTT é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazana, produto da redução do tetrazolium MTT. A redução do MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida da função mitocondrial. A variação da atividade mitocondrial após 1 e 24 horas de incubação não foi significativa de acordo com o teste de ANOVA 2way ( $P > 0,05$ ). Os resultados ilustrados do composto Pc-iso quando comparados com o composto Pc-BSA também não foram significativos ( $P > 0,05$ ). A partir desses resultados podemos perceber que ambos os compostos não são tóxicos para as células.

## 6 CONCLUSÕES

6.1 A preparação da ftalocianina conjugada a BSA foi realizada a partir de material de partida de fácil acesso comercial. O caminho sintético utilizado seguiu o protocolo de ACHAR, LOKESH,(2004) e ACHAR, *et al.*,(1987) com algumas modificações apresentando um resultado com rendimento satisfatório.

6.2 A purificação e caracterização dos compostos intermediários sintetizados, assim como o composto final Pc-BSA seguiu os métodos tradicionais: cromatografia em coluna de sílica-gel, espectroscopia no infravermelho, espectroscopia no ultra-violeta-visível.

6.3 Os espectros de absorção dos compostos são característicos de ftalocianinas com sinais na região entre 650-700nm destacando-se, a ftalocianina conjugada a BSA que apresenta 2 sinais mais intensos (ombro) na região entre 650-700nm próprios de ftalocianinas que sofrem agregação.

6.4 A proporção de Pc-BSA estimada foi de 3:1 deduzida a partir da quantificação comparativa realizada pelo espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop®).

6.5 A Pc-iso interagiu com ambas as linhagens de células (Hep-2 e HeLa) de maneira uniforme e o aparecimento de vacúolos ocorreu somente após 12 e 24 horas de incubação para células Hep-2 e foi ausente para células HeLa. A Pc-BSA induziu o aparecimento de vacúolos nas células HeLa a partir de 1 hora de incubação e para as células Hep-2 somente após 12 horas de incubação, dados esses demonstrados por Microscopia de Fluorescência.

6.6 A Pc-BSA e a Pc-iso não apresentaram citotoxicidade na linhagem de células HeLa mesmo após 24 horas de incubação, através da análise por ensaio de MTT.

6.7 Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o bioconjugado sintetizado e estudado (Pc-BSA), tem características que apontam a potencialidade do composto na TFD.

## REFERÊNCIAS

- ACHAR, B.N.; LOKESH, K. S. Studies on tetra- amine phthalocyanines. **Journal of Organometallic Chemistry**. v. 689, p. 3357- 3361, 2004.
- ACHAR, B.N.; FOHLEN, G. M.; PARKER, J. A.; KESHAVAYYA, J. Synthesis and Structural Studies of Metal (II) 4,9,16,23- Phthalocyanine tetraamines. **Polyhedron**. V.6, p. 1463- 1467, 1987.
- ALI, H.; LANGLOIS, R.; WAGNER , J. R.; BRASSEUR, N.; PAQUETTE, B.; VAN-LIER , J. E. **Photochem. Photobiol.**,v 47, p. 713-718, 1988.
- ALMEIDA, R. D.; MANADAS, B. J.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C. B. Intracellular Signaling Mechanisms in photodynamic Therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1704, p.59-86, 2004.
- BALL, D. J. *et al.* The characterisation of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to *m*THPC and polyhaematoporphyrin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 45, p. 28-35, 1998.
- BELMONT, M. J.; MARABELLE, N.; MANG, T. S.; WAX, M. K. Effect of photodynamic therapy on the critical primary ischemia time of fasciocutaneous flaps. **Laryngoscope**. v. 109, p. 886-890, 1999.
- BRASSEUR, N.; LANGLOIS, R.; LA MADELEINE, C.; OUELLET, R.; VAN LIER, J. E. Receptor-Mediated Targeting of Phtalocyanines to Macrophages Via Covalent Coupling to Native or Maleylated Bovine Serum Albumin. **Photochemistry and Photobiology**. v.69, n.3, p. 345-352, 1999.
- BROWN, S. B.; BROWN E. A.; WALKER L. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**. v.5, p. 497-508, 2004.
- CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. **Nature Reviews Cancer**. v. 6, p. 535-545, 2006.
- COOK, M. J. *et al.* Highly substituted phthalocyanine derivatives as potential photosensitizers for photodynamic therapy of tumors. **Photodynamic Therapy of Cancer**. v. 2078. p.539-546, 1994.
- DELAEY, E. *et al.* A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 55, p. 27-36, 2000.
- DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUPT, K. R.; MITTEMAN, A. Photoirradiation therapy for the treatment of malignant tumours. **Cancer Res**. v. 38, p. 2628-2635, 1978.

-DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy. **J. National Cancer Institute**. v. 90, 12, p. 889-905, 1998.

-EDREI, R.; KIMEL, S. Oxygen depletion during in vitro photodynamic therapy: structure-activity relationships of sulphonated aluminum phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 50, p. 197- 203, 1999.

-FERNANDEZ, D. A.; AWRUCH, J.; DICELIO, L. E. Synthesis and photophysical properties of a new cationic water- soluble Zn phthalocyanine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 41, p. 227- 232, 1997.

-FILYASOVA, A. I.; KUDELINA, I. A.; FEOFANOV, A. V. A spectroscopic study of the interaction of tetrasulfonated aluminum phthalocyanine with human serum albumin. **Journal of Molecular Structure** . p. 173-176, 2001.

-GORMAN, A.A.A. **Photochemical & Photobiology** V 14, p.159-176,1992.

-GREBENOVÁ, D. Protein Changes in HL60 Leukemia Cells Associated with 5-Aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy. Early Effects on Endoplasmic Reticulum Chaperones. **Photochemistry and Photobiology**, v.72, n.1, p.16-22,2000.

-HAMBLIN, M.R.; MILLER, J. L.; ORTEL, B. Scavenger-Receptor Targeted Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**. v.72, n.4, p.533- 540, 2000.

-HAMMES, B. S.; KIEBER-EMMONS, MATTHEW, T.; SOMMER, R.; RHEINGOLD, A. L. Modulating the Reduction Potential of Mononuclear Cobalt(II) Complexes via Selective Deprotonation of Tris[(2-benzimidazolyl)methyl] amine. **Inorganic Chemistry**. v. 41, p.1351-1353, 2002.

-HARRIS , D. M. Biomolecular mechanics of laser bioestimulation. **J. Clin. Laser Med. Surg**. v. 27, p. 277-280, 1991.

-HENDERSON, B. W.; WALDOW, S. M.; MANG, T. S.; POTTER, W. R.; MALONE, P. B.; DOUGHERTY, T. J. Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumor following photodynamic therapy. **Cancer Res.**, v. 45, p.572-576, 1985.

-HERWIG, K.; OBWEGESER, A. JAKOBER, R. Photodynamic therapy in neurosurgery: a review. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 36. p.157-168, 1996.

-HUANG, J. D.; LO, P. C.; CHEN, Y. M.; LAI, J. C.; FONG, W. P.; NG, D. K. P. Preparation and in vivo photodynamic activity of novel silicon (IV) phthalocyanines conjugated to serum albumin. **Journal of Inorganic Biochemistry**. p. 946-951, 2006.

-IAN, J. MACDONALD; THOMAS, J. DOUGHERTY, Basic principles of photodynamic therapy: a review. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. v.05. p. 105- 129, 2001.

-JORI, G. Tumour photosensitizers approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 36, p. 87-93, 1996.

-KONAN, Y.N; GURNY, R; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v. 66. p. 89- 106, 2002.

-KRAMMER, B.; HEIDEGGER, W. Investigation of the combined effect of photodynamic cell treatment and hyperthermia by transmembrane resting potential measurement of human skin fibroblasts. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**. v. 39, p.109 – 113, 1996.

-LANGMACK, K.; MEHTA, R.; TWYMAN, P.; NORRIS, P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates- theory and practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 60. p. 37- 43, 2001.

-LIPSON, R. L.; BALDES, E. J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **Arch. Dermatol**. v. 82, p. 76-84, 1960.

-LUKSIENE, Z. Photodynamic Therapy: Mechanism of Action and Ways to Improve the Efficiency of Treatment . **Medicina**., v.39, p.1137-1150, 2003

-MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Quím. Nova**. v. 23, n. 2, p. 237-42, 2000.

-MEYER-BETZ F. Untersuchungen über die biologische Wirkung des Hematoporphyrins und andere Derivate des Bluts und Gallenfarbstoffs. **Arch Dtsch Klin Med** v.112, p. 476–503.1913.

-MINQUAN, T.; TATSUO, W.; HIROYUKI, S. Syntheses of novel unsymmetrically tetrasubstituted phthalocyaninato vanadyl and zinc complexes with a nitro or amino group. **Dyes and Pigments**. v. 52, p. 1- 8, 2002.

-MOAN, J.; PENG, Q.; KONGSHAUG, M.; EVENSEN, J. F.; ANHOLTt, H.; RIMINGTON, C. Sensitizer for photodynamic therapy of cancer: a comparison of the tissue distribution of Photofrin II and aluminum phthalocyanine tetrasulfonate in nude mice bearing a human malignant tumor. **Int. J. Cancer**. v.48, p.258-264, 1991.

-MOAN, J.; BERG, K.; BOMMER, J. C.; WESTERN, A. Action spectra of phthalocyanines with respect to photosensitization of cells. **Photochem Photobiol**. v.56, p.171-175, 1992.

-MORGAN, J.; OSEROFF, A. R. Mitochondria- based Photodynamic Anti-cancer Therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**., n.49, p.71-86, 2001.

-PAWLOWSKI, G.; HANACK, M. **Synthesis** , p. 287-289.,1980.

- PIETTE, J.; VOLANTI, C.; VANTIEGHEM, A.; MATROULE, J.; HABRAKEN, Y.; AGOSTINIS, P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane- bound photosensitizers. **Biochemical Pharmacology**. v. 66, p. 1651- 1659, 2003.
- SHARMAN, W. M.;VAN LIER, J. E.; ALLEN, C. M. Target photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. **Advanced Drug Delivery**. v.56, p.53- 76, 2004.
- SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic Therapy: a new concept im medical treatment. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**. v 33, p. 869-880, 2000.
- SILVA, A. R. **Análise das propriedades fotossensibilizantes do In (III)-mesotetrafenilporfirina para uso em Terapia Fotodinâmica**. 2003. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003.
- SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços recentes no Desenvolvimento de Medicamentos.**Quím. Nova**. v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.
- STAR W. M.; MARIJNISSEN, H. P. A.; VANDENBERGBLOK, A. E.; VERSTEEG, J. A. C.; FRANKEN, K. A. P.; REINHOLD, H. S. Destruction of rat mammary-tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. **Cancer research**., v.46, p.2532- 2540, 1986.
- SUTTON, J. M.; CLARKE, O. J.; FERNANDEZ, N.; BOYLE, R. W. Porphyrin, Clorin. And Bacterochorin Isothiocyanates: Useful Reagents for the Synthesis of Photoactive Bioconjugates.**Bioconjugate Chemistry**. v.13, p.249-263, 2002.
- TABATA, K.; FUKUSHIMA, K.; ODA, K.; OKURA, I. Selective aggregation of zinc phthalocyanines in the skin. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. v. 4,p. 278-284, 2000.
- TANAKA, T; SHIRAMOTO, S; MIYASHITA, M; FUJISHIMA, Y; KANEO, Y. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). **International journal of pharmaceutics**. v.277, p.39-61, 2004.
- TATTINI JR, V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, p. 127-136, 2006.
- URIZZI, P.; ALLEN, C.M.; LANGLOIS, R.; OULLET, R.; MADELEINE, C.; VAN LIER, J. E. Low- density lipoprotein- bound aluminum sulfophthalocyanine: targeting tumor cells for photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. v. 5, p. 154-160, 2001.

-VAZQUEZ, M. S.; ORTIZ, J.; NESTEROVA, I. V.; LÁZARO, F. F.; SANTOS, A. S.; SOPER, S. A.; VICENTE, M. G. H. Synthesis and Properties of Cell- Targeted Zn(II)-Phthalocyanine- Peptide Conjugates. **Bioconjugate Chemistry**. v.18, p. 410-420, 2007.

- WOOD, S. R.; HOLROYD, J.A.; BROWN, S.B. The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. **Photochemistry and Photobiology**. v.65, p. 397 – 402, 1997.

-ZHANG, S. J.; ZHEN, X. Z. 5-aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy in Leukemia Cell HL60. **Photochemistry and Photobiology**., v.1706, p.40-52, 2005.